

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Propiedades bioquímicas e inmunológicas de una enzima similar a trombina aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón")

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Gustavo Adolfo Sandoval Peña

Lima-Perú

2009

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), así como también en el Laboratorio de Hemostasia y Venenos y en el Laboratorio de Proteoma y Microsecuenciamiento de Proteínas y Péptidos del Instituto de Bioquímica Médica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro - Brasil.

A mis padres Maurilio y Carmen, por
su amor, confianza y por todos los
valores enseñados durante mi
infancia, les entrego a Uds. el fruto de
mi dedicación y esfuerzo

A mis hermanos Frank y Susan, por
su respeto y cariño, de quienes
siempre intento ser su ejemplo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarlequé, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por su asesoramiento, ayuda desinteresada y por todas las facilidades proporcionadas para el desarrollo de la presente tesis, así como también por todas las experiencias compartidas durante estos años.

A la Mg. Fanny Lazo y a la Mg. Edith Rodríguez, miembros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, quienes mediante sus enseñanzas y atención desinteresada me adiestraron en las diversas técnicas para el estudio de los venenos de serpiente, sin lo cual no hubiera podido culminar con la presente tesis.

A las Dras. Olga Palacios, Yrma Espinoza e Hilda Solis, miembros del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” de la UNMSM, así como a su director, el Dr. José María Guevara Duncan, por proporcionarme las facilidades técnicas y de equipamiento para el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas y por sus críticas, correcciones y sugerencias en la ejecución del presente trabajo.

A la Dra. Russolina Zingali, Jefa del Laboratorio de Hemostasia y Venenos y del Laboratorio de Proteoma y Microsecuenciamiento de Proteína y Péptidos, del Instituto de Bioquímica Médica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro - Brasil, por comprender la importancia de esta investigación y permitirme realizar una pasantía en su laboratorio, siendo ésta muy grata y de gran importancia para el enriquecimiento para mi formación científica.

A la Red de Macrouniversidades de América Latina y el Caribe, por el apoyo económico al otorgarme una beca para mi permanencia en el Instituto de Bioquímica Médica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro - Brasil, en los meses de marzo a junio del 2006, la cual me permitió culminar los experimentos de este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica, por el apoyo económico a través de Becas de Posgrado otorgadas en los años 2004 y 2008, las cuales me permitieron culminar los estudios de maestría en esta casa de estudios y así finalizar con la sustentación de la presente tesis.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	5
Antecedentes	8
Materiales y Métodos	
1. Material Biológico	12
2. Reactivos	12
3. Cuantificación de proteínas	15
4. Purificación de la enzima similar a trombina	15
5. Actividad Enzimática	16
6. Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular	17
7. Determinación de azúcares asociados	18
8. Digestión <i>in gel</i> e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	19
9. Protocolo de inmunización	20
10. Detección de anticuerpos contra la EST del veneno de <i>B. atrox</i> y determinación de la reactividad cruzada contra otros venenos de serpiente	21
Resultados	
1. Purificación de la enzima	22
2. Pureza y peso molecular de la enzima	22
3. Actividad sobre diferentes sustratos	23
4. Contenido de carbohidratos	23

5. Análisis de la enzima purificada mediante espectrometría de masas	24
6. Detección y título de anticuerpos contra la EST del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	24 25
7. Reactividad cruzada determinada por ELISA	

Discusión

1. Enzima similar a trombina	26
2. Purificación de la enzima similar a trombina de <i>Bothrops atrox</i>	27
3. Pureza y Peso Molecular	31
4. Actividad sobre sustratos sintéticos	32
5. Naturaleza glicoproteica	33
6. Identificación de la enzima similar a trombina mediante espectrometría de masas	34
7. Inmunogenicidad de la enzima similar a trombina del veneno de <i>B. atrox</i> y su reactividad contra otros venenos de serpientes	36

Conclusiones	42
---------------------	----

Referencias Bibliográficas	43
-----------------------------------	----

Ilustraciones

<i>Figura 1.</i> La serpiente peruana <i>Bothrops atrox</i> ("jergón")	55
<i>Figura 2.</i> Esquema de la coagulación sanguínea y de la fibrinólisis mostrando los sitios de acción de las proteínas de veneno de serpientes	56
<i>Figura 3.</i> Sustratos sintéticos empleados para la caracterización de la	

enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana	57
<i>Bothrops atrox</i>	
Figura 4. Esquema de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	58
Tabla 1. Cuadro resumen de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	59
Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) bajo condiciones no reductoras de la enzima similar a trombina de <i>Bothrops atrox</i>	60
Tabla 2. Actividad del veneno total y de la enzima similar a trombina de <i>Bothrops atrox</i> sobre diferentes sustratos	61
Tabla 3. Contenido de carbohidratos del veneno crudo y de la enzima similar a trombina de <i>Bothrops atrox</i>	62
Tabla 4. Contenido de carbohidratos y peso molecular de enzimas similares a trombina aisladas de diferentes venenos de serpiente	63
Figura 6. Espectro de masas de los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de la enzima similar a trombina de <i>Bothrops atrox</i>	64
Figura 7. Vista principal del programa on-line MASCOT en la modalidad <i>Peptide Mass Fingerprint</i>	65
Figura 8. Resultados obtenidos del análisis <i>in silico</i> mediante el programa MASCOT.	66
Figura 9. Análisis de los fragmentos obtenidos de la espectrometría de masas empleando el programa MASCOT	67
Figura 10. Detección de IgG anti-EST de <i>B. atrox</i> en el suero de conejos inmunizados mediante la técnica de ELISA	68
Figura 11. Evaluación de la reacción inmunológica cruzada del suero	

anti-EST con la EST de *B. atrox* y algunos venenos de serpientes
peruanas mediante la técnica de ELISA

69

ABREVIATURAS

kDa	Kilodaltons
rpm	Revoluciones por minuto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'- tetrametiletilendiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
TOF	Time-of-flight
MS	Mass spectrometry
BApNA	Benzoil arginil p-nitroanilida
BAEE	Benzoil arginil etil ester
EST	Enzima similar a trombina
PAB	<i>p</i> -aminobenzaminidina
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
U	Unidades de actividad
M	Molar

RESUMEN

Se han determinado las principales propiedades bioquímicas e inmunológicas de la enzima similar a trombina (EST) de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). Para este fin, la enzima fue purificada hasta la homogeneidad utilizando tres pasos cromatográficos en Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 y Agarosa-PAB. Asimismo, se determinó el peso molecular por PAGE-SDS y el porcentaje de carbohidratos asociados mediante hidrólisis y análisis de hexosas, hexosaminas y ácido siálico. Luego se ensayaron las actividades fibrinocoagulante, amidolítica y esterásica, sobre fibrinógeno bovino, BApNA y BAEE, respectivamente, así como la hidrólisis sobre los sustratos cromogénicos S-2238, S-2251 y S-2266 y finalmente se realizó la identificación de la enzima aislada mediante la técnica de *peptide mass fingerprinting*. Para el análisis inmunoquímico, se inmunizaron conejos albinos con 150 µg de la enzima purificada a fin de obtener un suero hiperinmune anti-EST de *B. atrox*. Posteriormente se analizaron los patrones de reactividad inmunológica del suero contra la enzima purificada y los venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* mediante la técnica de ELISA.

Como resultado del análisis bioquímico se determinó que la enzima constituye el 1.7% del veneno completo, siendo purificada 25.5 veces y con un rendimiento del 43.3% utilizando BApNA como sustrato. La enzima presenta un peso molecular de 29.6 kDa, del cual el 14.2% lo constituyen los carbohidratos asociados, asimismo la EST de *B. atrox* produjo coagulación del fibrinógeno bovino y presentó actividad sobre BAEE, BApNA, S-2238 y S-

2266, siendo incapaz de hidrolizar el sustrato S-2251. El análisis mediante espectrometría de masas de los péptidos obtenidos por la hidrólisis de la EST de *B. atrox* permitieron relacionarla con la proteína venombina A, presentando una homología en secuencia del 75% con esta proteína. Al finalizar el protocolo de inmunización se obtuvo un suero hiperinmune anti-EST de *B. atrox* con un título de 64000, siendo evidencia del potencial inmunogénico de esta proteína. Por otro lado, los anticuerpos producidos reaccionaron de forma cruzada con los venenos completos de *B. atrox* (9.9%) y *B. brazili* (9.6%) y en menor intensidad con los de *L. muta* y *C. durissus*, con valores de 5.1% y 4.8%, respectivamente.

De esta forma se ha logrado purificar y caracterizar al principal componente del veneno de *B. atrox* relacionado con su actividad coagulante, así como determinar su identidad y reactividad inmunoquímica contra otros venenos de serpientes.

Palabras claves: *Bothrops atrox*, enzima similar a trombina, veneno, coagulación.

SUMMARY

We have determined the main biochemical and immunological properties of a thrombin-like enzyme (TLE) isolated from *Bothrops atrox* Peruvian snake venom ("jergón"). In this concern, TLE was purified until homogeneity using three chromatographical steps on Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 and Agarose-PAB. Furthermore, molecular weight was determined by PAGE-SDS and associated carbohydrates by hydrolysis and analysis of hexoses, hexosamines and sialic acid. Then, fibrinocoagulant, amidolytic and steric activities were measured on bovine fibrinogen, BApNA and BAEE, respectively, hydrolysis on S-2238, S-2251 and S-2266 chromogenic substrates, and finally molecular identity of this enzyme was determined by peptide mass fingerprinting technique. For the immunochemical analyses, white rabbits were immunized with 150 µg of EST and an hyperimmune serum anti-TLE was obtained. Patterns of immunological reactivity were determined between this serum against TLE and venoms of *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* using ELISA technique.

As a result of biochemical analysis, we determined that this enzyme represents 1.7% of total venom and was 25.5-fold purified with a 43.3% yield, using BApNA as substrate. This enzyme had 29.6 kDa, where 14.2% was associated carbohydrates. The TLE of *B. atrox* produced coagulation of bovine fibrinogen and had enzymatic activity on BAEE, BApNA, S-2238 and S-2266, being unable to act on S-2251. Mass spectrometry analysis of hydrolyzed EST of *B. atrox* results on a 75% sequence homology with venombin A protein. At the final of immunization protocol, we obtained an

anti-TLE hyperimmune serum with a title of 64000, which showed the potential immunogenicity of this protein. On the other hand, raised antibodies cross-reacted with total venoms of *B. atrox* (9.9%) y *B. brazili* (9.6%) and with less intensity with those from *L. muta* and *C. durissus* (5.1% and 4.8%, respectively).

In conclusion, we have purified and characterized the main component of *B. atrox* venom related to its coagulant activity. Also, we have determined its molecular identity and immunochemical reactivity against other snake venoms.

Key words: *Bothrops atrox*, thrombin-like enzyme, venom, coagulation.

INTRODUCCIÓN

Desde los albores de la humanidad y en casi todos los pueblos primitivos, la serpiente ha tenido un rol importante como símbolo de traición y muerte, o en otros casos como representación de sabiduría, salud y fertilidad (Russell, 1983).

Contra muchas de estas creencias, la investigación científica ha demostrado que las serpientes son animales tímidos que huyen del hombre y que sólo atacan cuando se sienten agredidas, o cuando involuntariamente alguien las golpea o inquieta. Su dependencia del clima hace que ellas sean muy activas a temperaturas iguales o mayores a 25 °C y tengan poco movimiento cuando ésta descende, siendo significativo el hecho que un cambio brusco de temperatura puede causarles la muerte al producirles una neumonía. Por ejemplo, para poder extraer el veneno en muchos serpentarios, se baja la temperatura ambiental y con ello se logra una mejor manipulación de los ofidios (Pope, 1955).

Existen especies representativas de serpientes en algunos lugares del mundo que han sido y son motivo de intensos estudios para conocer su comportamiento, método de reproducción, composición de su veneno y con todo ello definir los procedimientos apropiados para prevenir y atender una mordedura (Underwood, 1979). En el caso de los países de América del Sur, el Perú tiene el privilegio de albergar una variada fauna de serpientes hasta ahora poco estudiadas, circunstancia que ha motivado el interés de muchos científicos por este grupo de reptiles (Campbell y Lamarck, 1989). Esto hace

que el estudio de los ofidios en nuestro país sea un área prioritaria de investigación, por el peligro que representan algunas especies de serpientes venenosas, las cuales son responsables de frecuentes accidentes que en su mayoría resultan fatales para el hombre (Instituto Nacional de Salud, 2004).

De los numerosos estudios realizados con venenos de serpientes, se ha demostrado que estos son complejos proteicos farmacológicamente activos, de naturaleza heterogénea y altamente antigénicos (Chippaux y Goyffon, 1998), sin embargo, el estudio bioquímico de los venenos es aún insuficiente, siendo necesario realizar investigaciones más detalladas al respecto.

Las serpientes del género *Bothrops* habitan una extensa región de América que abarca desde México hasta Argentina, habiéndose descrito en nuestro país hasta 17 especies de este género (Meneses, 1974), siendo *Bothrops atrox* ("jergón") la más abundante y peligrosa (Carrillo e Icochea, 1995). Esta especie habita una amplia región de la selva sudamericana, comprendiendo los territorios de Argentina, Bolivia, Colombia y Panamá (Campbell y Lamarck, 1989). En el Perú se encuentra distribuida tanto en la Selva Baja como en la Selva Alta hasta los 2000 msnm, abarcando los departamentos de Amazonas, Loreto, San Martín, Ucayali, Huánuco, Pasco, Junín, Ayacucho, Cuzco y Madre de Dios (Loja *et al.*, 2000).

Morfológicamente, *Bothrops atrox* se caracteriza por presentar una cabeza triangular, aguda a manera de una lanza. Presenta foseta loreal y un cuerpo robusto que llegan a tener una variedad de colores opacos tales como plomo, marrón y verde olivo, en cuyo dorso se evidencian manchas con figuras triangulares de bordes negruzcos, cuyos ápices apuntan a la columna

vertebral. Puede alcanzar un tamaño de 2.4 metros y se alimenta de animales pequeños, aves y otros reptiles, incluyendo serpientes (DeGroot, 2000). Esta especie es la más abundante y peligrosa debido a su característica poco común en los ofidios de responder agresivamente ante la presencia del hombre (Yarlequé, 2000). Se calcula que por lo menos el 90% de los accidentes ofídicos en el país es causado por esta serpiente (Loja *et al.*, 2000).

Dentro de los trabajos realizados en relación a la composición bioquímica del veneno de *Bothrops atrox* existen algunos en los cuales se ha determinado que éste posee una acción coagulante muy marcada (Loayza *et al.*, 1985; Orejuela *et al.*, 1991), la cual es una de las características de su acción biológica, produciendo coágulos que a su vez bloquean parcialmente la circulación sanguínea. En este aspecto, las enzimas similares a trombina (EST) son los principales componentes relacionados con este fenómeno (Lu *et al.*, 2005). Como consecuencia de la mordedura se presenta dolor muy intenso en la zona afectada, edema, hemorragia y un severo descenso de la presión arterial que ocasiona la muerte; en otros casos se observa una masiva necrosis que lleva a la amputación del miembro afectado (Kaiser y Michel, 1986).

Es interesante mencionar además los usos terapéuticos de las enzimas similares a trombina obtenidas de otras especies de serpientes, las cuales han sido utilizadas en humanos para contener hemorragias locales debido a su alta capacidad para coagular la sangre, o como agentes profilácticos en terapias defibrinogénicas, es decir, cuando los pacientes requieren que se les reduzca la concentración de fibrinógeno plasmático y con ello evitar una trombosis (Stocker, 1990a; Stocker, 1990b). Por ello se hace necesario continuar y profundizar los estudios bioquímicos de los principios activos de

venenos de las especies de serpientes peruanas, como la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox* purificada en este trabajo, así como la de los venenos de *Lachesis muta*, *Bothrops brazili*, *Bothriopsis bilineatus*, *Bothrops pictus* y *Bothrops barnetti*, las cuales fueron identificadas y caracterizadas parcialmente en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Yarlequé, 2000).

En este contexto, en el presente trabajo nos propusimos en primer lugar purificar la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* mediante técnicas cromatográficas, así como caracterizarla bioquímica e inmunológicamente, determinando su reactividad cruzada con otros venenos de serpiente.

ANTECEDENTES

Desde tiempos remotos, las serpientes han sido consideradas como los animales más cautelosos y peligrosos, a tal punto que muy pocas personas se sintieron estimuladas para realizar estudios sobre tales ofidios, más aún si eran venenosas, debido fundamentalmente a los peligros que representan sus mordeduras (Lee, 1979).

Durante mucho tiempo, las serpientes fueron cubiertas de una serie de mitos y supersticiones. Moïse Charas (1685) por ejemplo sostenía que las mordeduras de éstas eran peligrosas sólo cuando el animal estaba irritado (*apud* Lee, 1979). Posteriormente, Redi en 1664 demostró después de múltiples observaciones que no sólo el veneno era efectivo cuando se inyectaba bajo la piel e inefectivo por vía oral, sino que tales venenos eran igualmente peligrosos si provenían de serpientes vivas o muertas recientemente (*apud* Lee, 1979). Sin embargo, no fue hasta 1884, donde se tuvieron las primeras evidencias de que los venenos de serpientes contenían enzimas proteolíticas, capaces de destruir los tejidos de los mamíferos, así como de hidrolizar las proteínas inmersas en sus fluidos biológicos (Nahas *et al.*, 1964). Además, también se ha determinado que varios venenos contienen también factores coagulantes y anticoagulantes de la sangre (Labib *et al.*, 1981).

Existen más de 300 especies de serpientes venenosas que se distribuyen por todo el mundo y son causantes de un número no exactamente determinado de accidentes mortales (Campbell y Lamarck, 1989). En nuestro país, las

serpientes venenosas están agrupadas en dos familias: La familia Viperidae y la familia Elapidae, siendo la primera de gran importancia patológica por ser muy venenosa y peligrosa para el hombre. Dentro de la familia Viperidae, se encuentra por ejemplo la “shushupe” (*Lachesis muta*) considerada una de las serpientes venenosas de mayor tamaño en el mundo ya que alcanza una longitud de hasta 4 m. Se ha determinado que el veneno de esta serpiente tiene actividad proteolítica, hemorrágica y coagulante, siendo responsable de esta última una enzima similar a trombina, la cual es capaz de transformar el fibrinógeno circulante en fibrina (Yarlequé *et al.*, 1989, Magalhaes *et al.*, 2003).

La coagulación sanguínea es la resultante de un complicado proceso cuya etapa final es la transformación de fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina. Sin embargo, muchos compuestos de naturaleza proteica intervienen para producir el coágulo de fibrina, el cual puede ser posteriormente removido por acción de la plasmina, enzima que se encuentra en la sangre bajo la forma de plasminógeno, en un proceso denominado fibrinólisis (Fig. 2). De esta manera se puede decir que existe un equilibrio entre ambos procesos. Además, también se conocen factores que incrementan la permeabilidad de los vasos capilares generando la salida de la sangre al espacio extravascular, fenómeno denominado hemorragia. Del mismo modo, varias proteasas de venenos de serpiente han sido reportadas como responsables del efecto hemorrágico (Kamiguti *et al.*, 1996).

Otro integrante de la familia Viperidae lo constituye el género *Bothrops*, que cuenta con 17 especies distribuidas en diversas regiones naturales del Perú (Meneses, 1974). Dentro de las especies del género *Bothrops* se encuentra la serpiente *Bothrops atrox* “Jergón”. Se han reportado casos de envenenamiento

humano producidos por la mordedura de este ofidio presentándose como consecuencia edema local, hemorragia que puede derivar en necrosis y en los casos graves hipotensión y producción de uremia (Loja *et al.*, 2000).

En el veneno crudo de *Bothrops atrox* se ha determinado la presencia de actividades enzimáticas tales como proteolítica, esterásica, fibrinolítica y kininogenásica (Loayza *et al.*, 1985), así como la de 5' nucleotidasa (Heredia *et al.*, 1982). Posteriormente se consiguió aislar una proteasa de bajo peso molecular denominada atroxina (Pantigoso *et al.*, 1996) y una miotoxina de bajo peso molecular (Huatuco *et al.*, 2004). En cuanto a la actividad similar a trombina, ésta fue detectada en varios venenos botrópicos incluido *B. atrox* utilizando como sustratos tanto plasma bovino como fibrinógeno bovino y canino (Orejuela *et al.*, 1991).

Se han purificado enzimas similares a trombina de diferentes venenos, tales como la del veneno de *Crotalus horridus horridus* (Bonilla, 1975), *Agkistrodon contortrix contortrix* (Herzig *et al.*, 1970), *A. acutus* (Ouyang, 1957), *Trimeresurus okinavensis* (Anderson, 1972) y *Bitis gabonica* (Pirkle *et al.*, 1986), siendo esta lista actualizada constantemente (Pirkle, 1998). La crotalasa del veneno de la cascabel norteamericana *Crotalus adamanteus* (Markland y Damus, 1971), así como enzimas similares a trombina de venenos del género *Bothrops*, son utilizadas en humanos para contener hemorragias locales por su alta capacidad para coagular la sangre (Funk *et al.*, 1971; Stocker *et al.*, 1974; Stocker, 1990a). Se ha podido determinar también que la mayoría de enzimas similares a trombina de vipéridos remueven el fibrinopéptido A del fibrinógeno para la formación de fibrina, a diferencia de la trombina que remueve los fibrinopéptidos A y B (Stocker, 1982; Castro *et al.*, 2004). Es por

esto que, por el modo de acción que estas proteínas suelen tener sobre fibrinógeno, se sugiere la rápida formación de microcoágulos que a su vez serían destruidos por el sistema fibrinolítico originando un descenso notable en la concentración normal del fibrinógeno y consecuentemente una tendencia creciente a la hemorragia (Kini, 2005). De otra parte, la nula acción mostrada por la heparina en el bloqueo de esta actividad enzimática le permite una rápida acción coagulante. Algunas de estas enzimas tienen utilidad clínica potencial para el tratamiento de enfermedades humanas, ya que se emplean como agente defibrinogénicos, y son ampliamente usadas en los laboratorios para la detección de fibrinógeno en muestras de sangre heparinizada (Braud *et al.*, 2000).

Si bien es cierto se han desarrollado técnicas para purificar la enzima similar a trombina de otros venenos ofídicos, las peculiaridades de la ponzoña de *Bothrops atrox* exigen una cuidadosa exploración de las características químicas de sus componentes para luego intentar el aislamiento de dicha enzima. En este aspecto se ha reportado la presencia de isoformas y variantes geográficas de la acción coagulante para el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* de Brasil (Cavinato *et al.*, 1998; Petretski *et al.*, 2000). Por ello, no se puede generalizar en términos absolutos el uso de una técnica, debiendo examinarse los pasos de purificación de acuerdo a cada muestra en estudio.

Por otro lado resulta interesante mencionar que si bien las enzimas similares a trombina constituyen herramientas muy útiles en el campo clínico siendo usados como agentes antihemostáticos (Stocker *et al.*, 1982), existen muy pocos estudios relacionados con la evaluación inmunogénica de este grupo de proteínas diseñados básicamente para la estandarización de métodos

inmunoenzimáticos utilizados en la detección de estos compuestos tanto *in vitro* como *in vivo* (Nakamura *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993), dilucidar su utilidad en la investigación biomédica (Claus y Mebs, 1989; Tan y Ponnudurai, 1994), así como conocer algunos de los parámetros farmacocinéticos que estas enzimas tendrían dentro del organismo (Nakamura *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Venenos

Se utilizó el veneno de ejemplares adultos de *Bothrops atrox* procedentes de Pucallpa (Ucayali), los cuales fueron mantenidos en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM. El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas, siendo luego liofilizado y conservado a 4 °C hasta su utilización en las pruebas experimentales correspondientes.

Para evaluar la reactividad cruzada se emplearon venenos totales de las especies: *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus*, procedentes de ejemplares mantenidos en el mismo serpentario.

Animales de laboratorio

Para la preparación de anticuerpos policlonales se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda (2 kg aprox.) los cuales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM.

2. Reactivos

Sustratos

- Fibrinógeno bovino disuelto en buffer fosfato salino (PBS) 0.02 M, pH 7.4, hasta una concentración de 5 mg/mL.
- Benzoil Arginil *p*-nitroanilida (BApNA), disuelto en dimetil sulfóxido hasta una concentración de 0.09 M. Para los ensayos, el BApNA fue disuelto hasta una concentración de 0.9 mM en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 8.1.
- Benzoil Arginil Etil Ester (BAEE), disuelto en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 hasta una concentración de 2 mM.

Los reactivos anteriores fueron productos de la compañía Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

- S-2238 (H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para trombina).
- S-2251 (H-D-valil-leucil-lisina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para plasmina).
- S-2266 (H-D-valil-leucil-arginina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para kalikreína glandular).

Los reactivos anteriores fueron productos de la compañía Chromogenix (Möln dal, Suecia). Estos fueron disueltos en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5 conteniendo NaCl 0.15 M, hasta una concentración final de 100 μ M.

Soluciones amortiguadoras

- Buffer Acetato de Amonio 0.05 M, pH 6.0
- Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.02 M, pH 7.4
- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4
- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5, NaCl 0.15 M
- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 8.1

Soluciones para electroforesis

- Buffer del gel de resolución: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
- Buffer del gel de apilamiento: Tris-HCl 1 M, pH 6.8
- Buffer de muestra: Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%
- Buffer de corrida: Tris-HCl 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1%

Soluciones para la prueba de ELISA

- Buffer de cubierta: carbonato de sodio 0.015 M, bicarbonato de sodio 0.035 M, pH 7.6
- Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.15 M, pH 7.4
- Buffer de incubación: leche descremada 5%, Tween-20 0.05% en PBS pH 7.4
- Buffer de lavado: NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05%
- Buffer de bloqueo: leche descremada 3%, Tween-20 0.05% en PBS pH 7.4

Patrón de Peso Molecular

Se empleó un kit de calibración de proteínas de bajo peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (Amersham Biosciences). La mezcla contenía: fosforilasa b (97 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactalbumina (14.4 kDa).

Geles para Cromatografía

Para el fraccionamiento del veneno de *Bothrops atrox* y purificación de la enzima similar a trombina se emplearon columnas cromatográficas de filtración molecular, de intercambio iónico y de afinidad, tales como Sephadex G-75, CM Sephadex C-50 y Agarosa - *p*-aminobenzamidina (PAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

3. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm (Warburg y Christian, 1941) en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además se empleó el método de Lowry *et al.* (1951) modificado en nuestro laboratorio (Loayza *et al.*, 1985) utilizando un fotolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, tomando a la albúmina sérica bovina como proteína estándar.

4. Purificación de la enzima similar a trombina

La metodología de purificación utilizada se basó en el procedimiento reportado por Yarlequé *et al.* (1989) para el aislamiento de la EST de *Lachesis muta*. Como primer paso, se aplicaron 200 mg de veneno crudo disueltos en 2 mL de buffer acetato de amonio 0.05 M, pH 6.0 a una columna de Sephadex G-75 (1.2 x 45.2 cm). La muestra fue eluída con el mismo buffer a un flujo de 13 mL por hora, colectándose fracciones de 1 mL en un colector automático de fracciones Pharmacia-LKB. Se determinó la cantidad de proteína presente en las fracciones y se midió la actividad amidolítica de cada una de éstas sobre BApNA.

Las fracciones con mayor actividad fueron juntadas, concentradas y aplicadas a una columna de CM Sephadex C-50 (1.2 x 35 cm), usándose como eluyente buffer acetato de amonio 0.05 M, pH 6.0. Las fracciones retenidas en el sistema cromatográfico fueron eluídas utilizando el mismo buffer conteniendo NaCl 0.4 M. Luego, las fracciones con mayor actividad amidolítica fueron juntadas, dializadas contra agua destilada y liofilizadas.

Para el tercer paso cromatográfico, las fracciones anteriores, resuspendidas previamente en buffer Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.5 M, pH 7.5, fueron aplicadas a una columna de Agarosa-PAB (0.8 x 6.0 cm). Las fracciones retenidas por afinidad fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0.5 M, pH 3.0 y neutralizadas usando Tris 1 M. Finalmente las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron concentradas y mantenidas en congelación hasta su uso.

5. Actividad Enzimática

Actividad Fibrinocoagulante (Devi et al., 1972)

Esta prueba consiste en medir el tiempo de formación del coágulo originado por la acción de la enzima similar a trombina del veneno sobre el fibrinógeno. La mezcla de reacción contenía 0.2 mL de fibrinógeno bovino (5 mg/mL) en PBS y 0.1 mL del veneno o la enzima, para luego medirse el tiempo de coagulación total. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

Actividad Amidolítica (Erlanger et al., 1961)

Fue determinada empleando BApNA como sustrato, midiéndose la liberación de *p*-nitroanilida en el rango de luz visible. La mezcla de reacción contenía 1 mL de BApNA a una concentración de 0.9 mM, 0.45 mL de buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 8.1 y 50 μ L del veneno o la enzima en estudio. Luego de 10 minutos a 37 °C, se adicionó 1 mL de ácido acético al 60% para detener la reacción, midiéndose finalmente la absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad (U) es expresada como μ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

Actividad Esterásica (Schwert y Takenaka, 1955)

Esta actividad fue determinada midiendo la hidrólisis del sustrato BAEE. Se mezclaron 1.5 mL de BAEE 2 mM y 1.4 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4,

y luego de 3 minutos de pre-incubación a 37 °C se adicionó 0.1 mL del veneno crudo o la enzima purificada midiéndose el incremento de la absorbancia a 253 nm. Una unidad de actividad (U) corresponde a la cantidad de μ moles de BAEE hidrolizados por minuto.

Actividad sobre otros sustratos sintéticos

Se emplearon los siguientes sustratos: S-2238 (H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para trombina), S-2251 (H-D-valil-leucil-lisina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para plasmina) y S-2266 (H-D-valil-leucil-arginina-*p*-nitroanilida, sustrato cromogénico para kalikreína glandular) provenientes de Chromogenix (Möln dal, Suecia), disueltos en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5 conteniendo NaCl 0.15 M, a una concentración final de 0.1 mM.

La hidrólisis de los sustratos sintéticos por el veneno crudo y por la enzima purificada fue medida en una lectora de microplacas Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA), siguiendo la absorbancia a 405 nm a 37 °C durante 20 min a intervalos de 10 s.

6. Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular

Se empleó la Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS), de acuerdo al método de Laemmli (1970), utilizando un equipo de electroforesis vertical en placa Mini-

PROTEAN 3. Para esto, 10 µg de la enzima fueron tratadas con 10 µL de buffer de muestra bajo condiciones no reductoras a 100 °C durante 5 min.

La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego de transcurrido el tiempo, el gel fue transferido a una solución colorante de azul brillante de Coomassie 0.1% por 10 min, para luego ser desteñido hasta evidenciar las bandas proteicas. El peso molecular de la enzima purificada fue estimado por comparación con una mezcla de calibración de proteínas para electroforesis en gel.

7. Determinación de azúcares asociados

Para la determinación de carbohidratos asociados a la enzima similar a trombina purificada se efectuaron las siguientes pruebas:

Determinación de hexosas

Mediante esta técnica, las hexosas asociadas a la proteína son hidrolizadas produciendo el hidroximetilfurfural, un compuesto incoloro intermediario, el cual reacciona con el orcinol, formando un compuesto coloreado que puede ser determinado fotolorimétricamente (Winzler, 1955). La mezcla de reacción contenía: 0.2 ó 0.4 mL del veneno crudo (1 mg/mL) o de la enzima purificada (0.2 mg/mL), completados con agua destilada hasta 0.5 mL; 2 mL del reactivo Orcinol-H₂SO₄, calentándose luego a 80 °C por 30 min y dejando enfriar en agua, para finalmente medir la absorbancia de esta mezcla a 540 nm.

Determinación de hexosamina

La prueba consiste en la hidrólisis ácida de la muestra, que provoca la liberación de la hexosamina y su acetilación con acetilacetona. Su posterior tratamiento con álcali forma un pirrol, el cual se une al *p*-dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Ehrlich) produciendo un derivado coloreado que puede ser determinado fotolorimétricamente (Winzler, 1955). La mezcla de reacción contenía: 0.2 ó 0.4 mL del veneno crudo (10 mg/mL) ó 0.5 mL de la enzima purificada (0.2 mg/mL), previamente hidrolizados con HCl en un baño de agua a 100 °C y neutralizados con NaOH 3 N, completándose hasta 0.5 mL con agua destilada. Luego, se adicionó 0.5 mL de acetilacetona, y se hizo hervir por 15 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de etanol al 95% y 0.5 mL del Reactivo de Ehrlich, midiéndose después de 30 min la absorbancia de esta mezcla a 530 nm.

Determinación de ácido siálico

Esta prueba se fundamenta en la remoción de los grupos acetilo o glicolilo del grupo amino del ácido siálico en un medio ambiente fuertemente ácido. El producto de esta reacción se oxida por la acción del periodato, para luego ser acoplada con ácido tiobarbitúrico y formar un derivado coloreado que es extraído con ciclohexanona, y luego medido por métodos fotolorimétricos (Warren, 1959). La mezcla de reacción contenía: 0.1 mL de veneno crudo (10 mg/mL) ó 0.2 mL de la enzima purificada (0.2 mg/mL) previamente calentados a 80 °C por 1 h en H₂SO₄ 0.1 N. Se añadió luego 0.1 mL de solución periodato y se dejó en reposo por 20 min a temperatura ambiente.

Después se adicionó 1 mL de solución de arsenito, agitando hasta desaparecer el color amarillo, y 2 mL de solución de ácido tiobarbitúrico luego de lo cual hirvió en un baño de agua a 100 °C por 15 min. Después de esta reacción, se separó una alícuota de 1.5 mL de la mezcla y se agregó ciclohexanona, en proporción 1:1, se agitó 2 veces y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 549 nm.

8. Digestión *in gel* e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Luego de realizada la electroforesis en geles de poliacrilamida, la banda correspondiente a la enzima similar a trombina fue escindida y rehidratada con acetonitrilo 50% en bicarbonato de amonio 25 mM. La proteína fue reducida con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM a 57 °C durante 1 h, y S-carbamidometilada con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM a temperatura ambiente durante 1 h.

La digestión *in gel* fue llevada a cabo con 12.5 ng/μL tripsina a 37 °C durante 15 h. Posteriormente, se mezclaron 0.5 μL de los fragmentos peptídicos con 0.5 μL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo 50% / TFA 1% (10 mg/mL) y luego aplicados a un espectrómetro de masas Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer, ABI, para su análisis mediante MALDI-TOF MS (del inglés, *matriz-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometry*) utilizando un rango de detección de 500 a 4500 Da.

Los pmfs (del inglés, *peptide mass fingerprints*) recuperados del procedimiento anterior fueron graficados utilizando el programa Data Explorer Versión 4.4 (Applied Biosystems) y analizados empleando el programa *on line* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) (Perkins *et al.*, 1999) siendo contrastados contra la base de datos de secuencias de proteínas para espectrometría de masas (MSDB). Mediante este análisis, los picos correspondientes a los pmfs son combinados *in silico* con los de proteínas conocidas permitiendo la identificación de la proteína digerida inicialmente (Fig. 7).

9. Protocolo de inmunización

Para la producción de anticuerpos anti-EST de *B. atrox*, se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda (2 kg aprox.), los cuales fueron inmunizados inicialmente con 150 µg de la EST del veneno de *B. atrox*, previamente emulsificados con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund (CFA) e inyectados por vía intradérmica, en cada uno de los animales en volúmenes de 0.25 mL seleccionando cuatro lugares del dorso. Luego de 10 días se aplicaron tres dosis de refuerzo con 150 µg de la enzima, preparadas en adyuvante incompleto de Freund (IFA) a intervalos de 20 días. Diez días después de aplicada cada dosis de refuerzo, se extrajo sangre a partir de la vena marginal de la oreja y al finalizar el protocolo de inmunización, la sangre se obtuvo mediante punción cardíaca, a fin de obtener los anticuerpos reactivos en el suero contra la proteína en estudio.

10. Detección de anticuerpos contra la EST del veneno de *B. atrox* y determinación de la reactividad cruzada contra otros venenos de serpiente

Los anticuerpos IgG anti-EST de *B. atrox* fueron detectados mediante la técnica de ELISA (Engvall y Perlmann, 1971), calculándose además el título correspondiente siguiendo el método de titulación a punto final (Alzamora *et al.*, 2002). Para ello se emplearon placas de 96 pocillos (Nunc-Immuno™, Dinamarca) cubiertas con 100 µL/pocillo de EST de *B. atrox* (1 µg/mL) disuelto en buffer de cubierta, durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados sucesivos empleando buffer de lavado, se aplicó en los pocillos buffer de bloqueo por 1 h a 37 °C. Luego de tres rondas de lavado, se aplicaron 100 µL/pocillo de suero de conejo obtenido al final del protocolo de inmunización (día 70), diluido seriadamente con factor 2 a partir de 1/1000 en el buffer de bloqueo, e incubados durante 1 h a 37 °C. Las placas fueron lavadas nuevamente y los anticuerpos unidos fueron detectados empleando anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/4000 en buffer de bloqueo) seguido de la adición del sustrato respectivo (100 µL/pocillo de *p*-nitrofenil fosfato disuelto en buffer Tris). Después de 30 min a 20-22 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pocillo de NaOH 3 M registrándose la absorbancia a 405 nm en un lector de placas Titertek Multiskan PLUS MKII. El título del suero respectivo correspondió a la inversa de la dilución del mismo la cual produjo un 50% de la máxima absorbancia registrada.

Por otro lado, se evaluó la reactividad cruzada del suero anti-EST de *B. atrox* contra los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *L. muta* y *C. durissus* siguiendo para esto los mismos parámetros utilizados en la detección de anticuerpos, y expresada como porcentaje de las densidades ópticas resultantes de la reacción entre los mencionados venenos y el suero anti-*B. atrox* considerando como 100% el valor de absorbancia obtenido entre la EST de *B. atrox* y su

respectivo suero a una dilución equivalente al título obtenido para esta proteína.

RESULTADOS

1. Purificación de la enzima

En el primer paso de purificación (Fig. 4A), el veneno fue fraccionado en tres picos de proteína, encontrándose la actividad enzimática en las fracciones correspondientes al primer pico con un V_e/V_o de 1.50. La actividad amidolítica estuvo presente en estas fracciones, las cuales después de ser juntadas y concentradas fueron pasadas a través de una columna de CM Sephadex C-50.

En este segundo paso de purificación (Fig. 4B) la actividad amidolítica fue ubicada en las fracciones que se separaron de la matriz empleando NaCl 0.4 M. Dichas fracciones fueron dializadas contra agua destilada, liofilizadas y disueltas en buffer Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.5 M, pH 7.5 para ser aplicadas a una columna de Agarosa - PAB.

En este tercer paso de purificación (Fig. 4C) se consiguió la separación completa de la enzima luego de aplicar buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0.5 M, pH 3.0, lográndose una purificación de 25.5 veces, un rendimiento de 43.3% y 1.7% de proteína activa recuperada. En la Fig. 4 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos y en la Tabla 1 se indica lo referente al cuadro de purificación de la proteína en estudio.

2. Pureza y peso molecular de la enzima

El ensayo electroforético en PAGE-SDS en condiciones no reductoras mostró que la enzima purificada corresponde a una única banda homogénea. Los resultados demuestran que esta enzima presenta un peso molecular aproximado de 29.6 kDa (Fig. 5).

3. Actividad sobre diferentes sustratos

La enzima similar a trombina purificada fue capaz de coagular el fibrinógeno bovino; comparando los tiempos de coagulación obtenidos con el veneno crudo y la enzima purificada se encontraron actividades específicas de 1.26 y 5.50 U/mg respectivamente, siendo la actividad de la enzima purificada 4.37 veces más que la actividad del veneno crudo (Tabla 2).

La enzima purificada también muestra una gran capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos como el BApNA con una actividad específica de 0.874 U/mg, mientras que sobre ésteres sintéticos de arginina como el BAEE mostró una actividad de 45.83 U/mg, siendo la actividad purificada 25.5 y 23.4 veces, respectivamente, con respecto a la actividad mostrada por el veneno crudo (Tabla 2).

En el caso de las actividades sobre otros sustratos sintéticos específicos éstas fueron de 8.7 y 22.7 U/mg sobre S-2238 para el veneno crudo y la enzima purificada respectivamente, y de 7.8 y 23.4 U/mg sobre S-2266 para el veneno crudo y la enzima purificada respectivamente. No se encontró actividad

sobre S-2251 bajo las mismas condiciones de trabajo tanto para el veneno crudo como para la enzima purificada (Tabla 2).

4. Contenido de carbohidratos

El análisis de carbohidratos para el veneno crudo determinó un 1.83% de hexosas, 0.61% de hexosaminas y 0.19% de ácidos siálicos; es decir un total de 2.63% de carbohidratos asociados. En cambio la enzima purificada registró 12.1% de hexosas, 1.36% de hexosaminas y 0.75% de ácidos siálicos, con un total de 14.21% de carbohidratos, lo que demuestra que se trata de una glicoproteína (Tabla 3).

5. Análisis de la enzima purificada mediante espectrometría de masas

En la Fig. 6 se muestra el espectro de masas de los fragmentos peptídicos producto de la hidrólisis de la enzima purificada con tripsina. A partir del análisis en el programa Data Explorer Versión 4.4 (Applied Biosystems) se pudieron recuperar 24 fragmentos peptídicos con valores de masas comprendidos entre los 500 y 4500 Da, determinándose a su vez la intensidad de señal respectiva en escala porcentual.

Los valores de masas de fragmentos peptídicos obtenidos anteriormente fueron utilizados para la identificación de la proteína mediante el programa MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, opción: *peptide mass fingerprinting*). Como resultado del el análisis *in silico* se obtuvo

un *score* de alineamiento de 125 (expect: 10^{-6}) con la proteína denominada venombina A (EC 3.4.21.74) (Fig. 8). Para este análisis se utilizaron sólo 14 de los 24 péptidos recuperados para la proteína en estudio, los cuales comprenden un 75% del total de su secuencia (Fig. 9A). La venombina A es la enzima similar a trombina del veneno de *B. a. moojeni* y su secuencia de aminoácidos exhibe una homología significativa con enzimas proteolíticas como la tripsina, la kalikreina pancreática y la trombina, lo cual indica que se trata de un miembro de la familia de las serinoproteasas (Itoh *et al*, 1998).

6. Detección y título de anticuerpos contra el veneno de *Bothrops atrox*

Se realizó el seguimiento de la respuesta inmune de los conejos albinos mediante ELISA desde el día 0 hasta el día 70 del protocolo de inmunización. La Fig. 8 muestra los niveles de producción de anticuerpos IgG específicos contra la EST del veneno de *B. atrox*, la cual alcanzó su máximo valor después de la tercera dosis de refuerzo (día 50), y se mantuvo hasta el final del protocolo de inmunización. Asimismo, se determinó el título de anticuerpos anti-EST de *B. atrox* en el suero obtenido al final del protocolo de inmunización, el cual correspondió al valor de 64000 (Fig. 10).

7. Reactividad cruzada determinada por ELISA

Al evaluarse la reactividad del suero anti-EST de *B. atrox* contra los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *L. muta* y *C. durissus*, mediante la técnica de ELISA, se obtuvo un valor máximo de densidad óptica a 405 nm producto de la

reacción entre los anticuerpos anti-EST y la EST de *B. atrox* (Fig. 11). Además, se observó que el suero reaccionó de forma cruzada con los otros venenos de serpiente, pero con menor intensidad, siendo los valores de reactividad cruzada para los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *L. muta* y *C. durissus*, de 9.9%, 9.6%, 5.1% y 4.8% respectivamente.

DISCUSIÓN

El mecanismo de coagulación sanguínea es un proceso complicado que tiene como finalidad la conversión del fibrinógeno plasmático (factor I) en fibrina por acción de una proteasa específica, la trombina, que hidroliza los enlaces arginil-glicil del fibrinógeno. La molécula del fibrinógeno presenta una estructura trinodular, está formada por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, tales cadenas son 2 $A\alpha$, 2 $B\beta$ y 2 γ . La propiedad coagulante de la trombina radica en la liberación de dos pares de pequeños péptidos polares, los fibrinopéptidos A y B de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ respectivamente, convirtiendo al resto de la molécula en el monómero de fibrina. Estos monómeros a su vez se polimerizan espontáneamente mediante dos diferentes clases de interacciones moleculares, “extremo a extremo” y lateral, para formar el coágulo insoluble de fibrina.

1. Enzima similar a trombina

Los venenos de los vipéridos presentan cantidades significativas de enzimas similares a trombina y el mecanismo de formación del coágulo de fibrinógeno por acción de éstas es diferente al provocado por trombina. Estos componentes preferentemente liberan sólo fibrinopéptidos A o B, mientras que la trombina produce la liberación de ambos fibrinopéptidos de la molécula del fibrinógeno, es decir, los fibrinopéptidos A y B.

La mayor parte de las enzimas similares a trombina son serinoproteasas y no sólo son similares a la trombina en sus propiedades físicas y químicas sino que contienen residuos reactivos de serina, ácido aspártico e histidina como la trombina. Un hecho importante es que las actividades coagulante y esterásica de estas enzimas son inhibidas simultáneamente por agentes específicos que modifican la proteína, siendo éste un indicativo que dichas actividades parecen residir en el mismo sitio activo.

Generalmente las enzimas similares a trombina no son inhibidas por los principales inhibidores de la trombina, tales como la heparina, aún en presencia de plasma como fuente de antitrombina III, otro de estos inhibidores. De igual manera, la actividad de estas enzimas similares a trombina no se ve reducida por moléculas como la hirudina o inhibidores de proteasas inespecíficas.

Otro aspecto interesante de estas enzimas es que, presenten de forma altamente purificada y aplicados en animales o humanos produce un descenso en los niveles de fibrinógeno, resultando en un estado benigno de hipofibrinogenemia, razón por la cual es empleada en el campo clínico para el tratamiento de oclusiones vasculares y terapias defibrinogenantes. La dosis inicial de enzima es aplicada lentamente a fin de no generar complicaciones, ya que aplicaciones rápidas pueden causar formación de trombos.

Debe recordarse que las enzimas similares a trombina son coagulantes tanto *in vitro* como *in vivo* y que la incoagulabilidad de la sangre observada en las víctimas de mordedura por vipéridos se produce como consecuencia de la

reducción del fibrinógeno y la rápida acción del sistema fibrinolítico que destruye los coágulos de fibrina formados por estas enzimas (Lu *et al.*, 2005) (Fig. 2).

2. Purificación de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*

Las proteínas son macromoléculas cuyas unidades estructurales o monoméricas son los aminoácidos y que cumplen un papel básico en la función y arquitectura celular. Éstas presentan diferentes propiedades características, las cuales pueden ser aprovechadas para su separación, basándose principalmente en el tamaño molecular, solubilidad, carga eléctrica, diferencias en sus características de adsorción, asimismo por su afinidad biológica para otras moléculas.

La cromatografía es una técnica de separación que aprovecha la distribución diferencial de las sustancias entre una fase móvil y una fase estacionaria. De acuerdo a la naturaleza de las interacciones de las sustancias con la fase estacionaria, la cromatografía puede dividirse en: a) cromatografía de adsorción, b) cromatografía de reparto, c) cromatografía de intercambio iónico, d) cromatografía de penetrabilidad y e) cromatografía de afinidad.

En el caso de la cromatografía de filtración en gel, un tipo de cromatografía de reparto, ésta permite la separación de moléculas en función de sus propiedades físicas, forma y tamaño molecular, la cual se logra por el paso de la muestra a través de la fase estacionaria, formada por una resina porosa, y la fase móvil, constituida por agua o cualquier disolución electrolítica. La

separación de las moléculas (elución) es independiente del tipo de fase móvil utilizada (eluyente) o de características como su pH y fuerza iónica, ya que sólo es función de la forma, del tamaño molecular y de las dimensiones de los poros del gel. Este tipo de cromatografía es ampliamente aceptada debido a que es un método simple, rápido y puede ser usado siempre que exista una diferencia suficiente en relación a los pesos moleculares de los componentes de la muestra en estudio. Los resultados obtenidos proporcionan una buena purificación, el rendimiento aprovechable es bueno (casi el 100%) y es poco probable la denaturación de muestras lábiles tales como enzimas.

En relación a la cromatografía de intercambio iónico, ésta se basa en las interacciones electrostáticas entre los grupos ionizables de los productos a separar y los grupos cargados unidos covalentemente a un soporte o resina. Este tipo de cromatografía puede aplicarse a la separación de aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y en general a todos los compuestos de interés biológicos que tengan naturaleza iónica. Las resinas cargadas positivamente retienen iones cargados negativamente (aniones) y por ello se les denomina intercambiadores aniónicos. Las resinas cargadas negativamente retienen iones con carga contraria (cationes) y son denominados intercambiadores catiónicos. Los grupos fenólicos, carboxilos y sulfónicos se utilizan como intercambiadores catiónicos, mientras los grupos amino, alifáticos y aromáticos se utilizan como intercambiadores aniónicos.

Con respecto a la cromatografía de afinidad, esta técnica permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos y otras moléculas). En este caso, las proteínas que se retienen en la columna

son aquellas que se unen específicamente a un ligando previamente unido covalentemente a la matriz de una columna. Después de lavar o eluir las proteínas que no se unen al ligando, la proteína de interés inicialmente retenida se libera empleando una solución que contenga o bien al ligando libre o bien otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína. Generalmente se utiliza un cambio de pH el cual modifica las características de los sitios activos de las enzimas, eluyéndose así sólo el compuesto de interés. Entre las características de este tipo de cromatografía de afinidad están una alta selectividad en el mecanismo de retención, un campo de aplicación restringido y la capacidad de emplear estas columnas en sistemas bajo presión.

En el presente trabajo se utilizó como primer paso cromatográfico para la purificación de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*, una cromatografía sobre Sephadex G-75, sistema que permitió la separación del extracto proteico que constituye el veneno como puede apreciarse en la Fig. 4A. Se han diferenciado tres picos principales de proteína, correspondiendo la enzima a la porción correspondiente al primer pico. Esto nos indica que la proteína coagulante que hemos aislado se encuentra en torno a la fracción proteica de alto peso molecular que eluye con un volumen de elución (V_e) cercano al volumen vacío o muerto (V_o).

En el segundo paso (Fig. 4B), el uso de la columna de Carboximetil Sephadex C-50 (CM Sephadex C-50), que es una columna combinada de filtración molecular e intercambio catiónico posibilitó la separación de dos picos de proteína eluída con el buffer inicial que corresponde a la fracción proteica cargada negativamente y que por tal razón es repelida por el sistema que

tiene la misma carga. La enzima similar a trombina eluye al adicionarse al buffer NaCl 0.4 M y el hecho de que aparezca en el primer pico indica claramente que se encontraba atrapada por el intercambiador lo que significa que se trata de una proteína cargada positivamente a pH 6.0, es decir, que su pI estaría en el rango de neutro o ligeramente alcalino.

Como tercer paso cromatográfico (Fig. 4C) se empleó una columna de Agarosa - *p*-aminobenzamidina (PAB). Esta molécula es un inhibidor competitivo específico de serinoproteasas, mediante la cual se pudo retener a las fracciones con afinidad a ésta para su posterior separación mediante un cambio en el valor de pH de 7.5 a 3.0. Con esta metodología se consiguió separar a la enzima similar a trombina mientras que las fracciones que no se ligaron a la columna correspondían a proteínas contaminantes.

El análisis electroforético de las fracciones obtenidas (Fig. 5) demostró la existencia de una sola banda proteica y por tanto podemos afirmar que el método desarrollado es apropiado y sencillo para purificar esta enzima logrando un factor de purificación de 25.5 veces y un rendimiento de 43.3%.

Las enzimas similares a trombina purificadas de otros venenos han sido obtenidas mediante combinaciones de técnicas cromatográficas. Así tenemos que para la purificación de la balterobina, enzima coagulante aislada del veneno de *Bothrops alternatus*, se emplearon métodos cromatográficos sobre Sephadex G-75, Heparina-Sepharosa y HPLC (Smolka *et al.*, 1998). Del mismo modo Jin *et al.* (2005) purificaron la enzima jerdonobina-II del veneno de *Trimeresurus jerdonii*, aplicando la muestra en primer lugar a un intercambiador catiónico de CM Sephadex C-25, posteriormente a una

columna de filtración en Sephadex G-100 super fino y finalmente a una columna C₈ de HPLC en fase reversa. Finalmente la enzima similar a trombina del veneno de *Lachesis muta* fue aislada por Yarlequé *et al.* (1989) a través de tres pasos cromatográficos, los dos primeros en Sephadex G-100 y el último en una columna de intercambio iónico de DEAE-Celulosa, lográndose una purificación de 28.92 veces y un rendimiento de 44.76%

3. Pureza y Peso Molecular

La pureza de la muestra se evalúa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en los cuales, variando las concentraciones de los monómeros, pueden conseguirse diferentes reticulados de los polímeros. De esta forma, la separación se produce no sólo por la diferencia de carga, sino también por la diferencia de tamaño. En el caso de la electroforesis con SDS, la estructura nativa de las proteínas es modificada ya que este compuesto le confiere carga negativa suficiente a la molécula para que la separación se dé por su masa molecular. La desnaturalización incrementada por la temperatura permite que el SDS interactúe con la proteína generalmente a razón de una molécula de detergente por cada cuatro residuos de aminoácidos, dando como resultado que todas las proteínas tengan la misma densidad de carga siendo ésta proporcional a la masa molecular.

El análisis electroforético con SDS en condiciones no reductoras (Fig. 5) demostró que la enzima purificada presenta una sola cadena polipeptídica, con un peso molecular aproximado de 29.6 kDa. Esta enzima tiene un mediano peso molecular pero se encuentra dentro del rango de pesos

moleculares reportados para varias enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpiente (Tabla 4).

4. Actividad sobre sustratos sintéticos

La evaluación de las propiedades cinéticas de enzimas proteolíticas es complicada por dos hechos: 1) la naturaleza del sustrato: una proteína y 2) la especificidad de la enzima. Este tipo de enzimas reconoce el lado carboxilo de un residuo de aminoácido específico, el cual forma parte del enlace peptídico a ser hidrolizado. Por esta razón, se requiere de sustratos sintéticos que imiten las estructuras involucradas en el enlace peptídico del sustrato original. Generalmente son residuos de aminoácidos específicos para cada enzima, que tienen bloqueado el extremo amino por algún grupo químico que simula la continuación de la proteína. En el extremo carboxilo se une, químicamente, un grupo cromógeno como la *p*-nitroanilida, el cual es liberado como parte de la hidrólisis resultando en una forma fácil de detectarla. La hidrólisis de un sustrato sintético conocido permite la identificación de la especificidad de la enzima a estudiar y con un juego de varios sustratos e inhibidores se puede clasificar a una enzima. El uso de sustratos sintéticos da otra ventaja. Con ellos es posible realizar ensayos de actividad del tipo cinéticos; esto es, aquellos que permiten seguir el curso de la reacción conforme ésta ocurre.

En el presente estudio se evaluó la capacidad de la enzima similar a trombina aislada de *B. atrox* para hidrolizar diversos sustratos sintéticos que contienen

como grupo cromogénico a la *p*-nitroanilida (Fig 3). Durante los diversos pasos de purificación se empleó el sustrato BApNA el cual permite la caracterización de enzimas del grupo de las serinoproteasas como la tripsina y quimiotripsina y al cual pertenecen las enzimas similares a trombina de venenos de serpiente (Castro *et al.*, 2004). Las fracciones que mostraron más actividad sobre este sustrato fueron ensayadas en su capacidad para coagular el fibrinógeno bovino obteniéndose resultados positivos indicando que ambas actividades están presentes en la enzima en estudio. En el caso del TAME, por su estructura molecular permite la caracterización de enzimas que hidrolizan el enlace ester entre la arginina y el grupo metilo. La capacidad de la enzima para hidrolizar este sustrato nos indica que ésta pertenece al gran grupo de proteasas esterásicas (Castro *et al.*, 2001).

En el caso de los sustratos sintéticos S-2266, S-2238 y S-2251, su empleo nos permitió determinar la especificidad en reconocimiento de los aminoácidos unidos al grupo cromogénico *p*-nitroanilida por parte de la enzima similar a trombina de *B. atrox*. Como se muestra en la Tabla 2, la enzima fue capaz de hidrolizar los sustratos S-2266 (sustrato para kalikreína glandular) y S-2238 (sustrato para trombina), mientras que fue incapaz de hidrolizar el sustrato S-2251 (sustrato para plasmina). En base a las características estructurales de estos sustratos podemos afirmar que la enzima presenta una especificidad para hidrolizar sustratos que contengan preferentemente arginina como el aminoácido que se une al grupo cromogénico a diferencia de la lisina la cual se encuentra en la estructura del S-2251, lo cual constituye una evidencia adicional de que esta enzima pertenece al grupo de las serinoproteinasas. Este análisis también fue realizado utilizando la enzima similar a trombina de *Lachesis muta muta* empleando sustratos cromogénicos con aminoácidos

diversos en su estructura (Magalhães *et al.*, 2006). El hecho de que la enzima purificada hidrolice sustratos específicos para dos enzimas diferentes como la kalikreina y la trombina indican por un lado que nuestra enzima presenta características de la trombina como la de coagular el fibrinógeno, mientras que por otro está relacionada con las enzimas del grupo tripsina/kalikreína. Esto fue demostrado por Itoh *et al.* (1988) para el caso de batroxobina, la enzima similar a trombina de la serpiente *B. a. moojeni* mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del gen.

5. Naturaleza glicoproteica

Uno de los aspectos que se abarcó en esta investigación fue la asociación de carbohidratos a la estructura proteica de la enzima similar a trombina purificada. En primer lugar, se calculó que el veneno de *Bothrops atrox* contiene un 2.63% de carbohidratos asociados y que la enzima purificada mostró ser una glicoproteína, conteniendo 12.1% de hexosas, 1.36% de hexosaminas y 0.75% de ácido siálico (Tabla 3). El contenido de carbohidratos asociados a la enzima similar a trombina *B. atrox* de 14.21%, se encuentra dentro del rango reportado para numerosas enzimas similares a trombina aisladas de veneno de serpientes (Tabla 4). Un posible rol de los oligosacáridos en las glicoproteínas es el de modular sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad, viscosidad, estabilidad de carga. Respecto a este último punto, al tratar la enzima similar a trombina del *Lachesis muta* con una N-glicosidasa F (PNGasa F) y proceder a la electroforesis mediante PAGE-SDS, se observó un aumento en la movilidad electroforética de la proteína tratada en comparación con la proteína no

tratada (Magalhaes *et al.*, 2003). Otro rol probable de los carbohidratos sería el de proteger a la enzima de la proteólisis, teniendo en cuenta el entorno fuertemente proteolítico del veneno (Oshima e Iwanaga, 1969).

6. Identificación de la enzima similar a trombina mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que ha experimentado un gran desarrollo tecnológico en los últimos años. Permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica y obtener información cualitativa o cuantitativa. Mediante el análisis por espectrometría de masas es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo. Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en una fuente de ionización y actualmente, existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo como Impacto Electrónico (EI), Bombardeo con átomos rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) o Electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos ó simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

En el estudio de proteínas, la espectrometría de masas permite la identificación de éstas a través de la interpretación de los espectros de fragmentación de los péptidos generados a partir de su proteólisis (habitualmente con tripsina). La muestra es introducida en un espectrómetro de masas, por lo general, previo fraccionamiento mediante una nanocolumna (100 M de diámetro interno) de fase reversa (C18), permitiendo así la entrada secuencial de los péptidos generados en la proteólisis para su posterior fragmentación y aislamiento. Luego, la identificación de proteínas se realiza mediante las “huellas peptídicas” o “*fingerprints*” los cuales son comparados con una base de datos. Distintas características de las proteínas se utilizan para la búsqueda en las bases de datos: fuente biológica de la proteína, composición de aminoácidos, punto isoelectrico, masa molecular aparente en SDS-PAGE, etc. Sin embargo, esta estrategia es la más utilizada ya que para determinar la identidad de una proteína se vuelca en una base de datos de proteínas las masas provenientes de los digeridos protéicos (“huellas peptídicas”) obtenidos por espectrometría de masas y analizados con *softwares* específicos (por ejemplo, ProFound, Mascot, etc.). Como parte del análisis se comparan las masas de los péptidos de la proteína en estudio con las que provienen de digerir teóricamente las proteínas presentes en las distintas bases de datos. Si el genoma del organismo o especie está secuenciado y su información es accesible a las bases de datos públicas, esta búsqueda dará como resultado una proteína candidata con un grado de fiabilidad determinado.

En la presente investigación, se procedió al análisis por espectrometría de masas de las bandas de gel correspondientes a la enzima similar a trombina

de *B. atrox*. La diversidad de fragmentos peptídicos resultantes del análisis por MALDI-TOF fue comparada contra la base de datos de secuencias de proteínas para Espectrometría de Masas (MSDB) empleando el programa MASCOT (Fig. 7).

Como producto de la búsqueda se obtuvo un *score* de alineamiento de 125 (expect: 10^{-6}) con la venombina A (EC 3.4.21.74), enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *B. a. moojeni* (Fig. 8). Esta proteína, a diferencia de la trombina, convierte el fibrinógeno en fibrina liberando sólo el fibrinopéptido A (Itoh *et al.* 1988). Esta característica le confiere un efecto defibrinogenante permitiendo que la fibrina sea rápidamente degradada a través del proceso fibrinolítico y eliminado mediante la orina. Actualmente es usado en el campo clínico para el tratamiento de enfermedades trombóticas (Stocker, 1990a).

Este análisis nos permitió además ubicar y alinear los fragmentos producto de la digestión de la enzima en estudio. Los fragmentos recuperados cubrieron un 75% de la secuencia de la venombina A indicando una alta homología entre las secuencias de ambas proteínas, lo cual constituye una evidencia adicional para considerar a la enzima en estudio como una serinoproteasa (Fig. 9A).

7. Inmunogenicidad de la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* y su reactividad cruzada con otros venenos de serpientes

Los venenos de serpientes son mezclas altamente complejas de componentes principalmente proteicos y por esta razón, tanto estas ponzoñas como sus enzimas y toxinas purificadas, han sido utilizadas para la inmunización de diferentes tipos de animales de experimentación a fin de evaluar su potencial inmunogenicidad y para la elaboración de los antídotos respectivos. Hasta la fecha se han utilizado diversos protocolos de inmunización para la producción de antivenenos los cuales consideran diferentes parámetros para su obtención (Christensen, 1979; Theakston *et al.*, 2003); entre ellos se considera el tiempo necesario para obtener un título aceptable de anticuerpos, la edad del animal inmunizado y el empleo de adyuvantes. Además se debe tener en cuenta la naturaleza del antígeno y su toxicidad, así como la del antiveneno que se pretende producir (Heneine y Heneine, 1998).

En el presente estudio se utilizaron conejos albinos de raza Nueva Zelanda como animales de experimentación los cuales fueron inmunizados por vía subcutánea empleando cuatro dosis de 150 µg de la EST del veneno de *Bothrops atrox* durante un periodo de 70 días. A fin de garantizar la producción de altos títulos de anticuerpos en el suero, la enzima fue emulsificada con adyuvante completo de Freund (CFA) para la inmunización primaria y adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las dosis de refuerzo. Ambos co-adyuvantes son utilizados ampliamente por su capacidad de localizar a los antígenos en la zona de inoculación durante un periodo de tiempo prolongado, permitiendo la producción sostenida de anticuerpos (Herbert y Lumsden, 1968). La eficacia de este método fue monitoreado mediante la técnica de ELISA (Fig. 8) donde el aumento de la absorbancia a 405 nm, respectivamente, indicaron la formación de inmunocomplejos producto del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Como se puede apreciar,

los anticuerpos pudieron ser detectados a partir del día 20 y su producción fue sostenida alcanzándose los niveles máximos a partir del día 60 hasta el final del protocolo. En este aspecto, el procedimiento empleado resulta práctico, eficiente y de corta duración, convirtiéndolo en un método útil para la obtención de anticuerpos contra la EST del veneno de *Bothrops atrox*.

Es importante considerar que el envenenamiento por serpientes constituye un problema de salud muy importante en muchas partes del mundo, especialmente en los países en desarrollo y con una vasta selva como es nuestro caso (Instituto Nacional de Salud, 2004). En este aspecto se han desarrollado numerosos ensayos bioquímicos e inmunológicos con finalidad principal de identificar a la especie de serpiente responsable de una mordedura mediante la detección del veneno completo o de sus principales componentes tóxicos, así como los anticuerpos producidos que se encuentren en los fluidos corporales. Esto permitirá por un lado conocer las características farmacocinéticas de estos componentes *in vivo*, y por otro optimizar el uso de los respectivos antivenenos generándose datos epidemiológicos correctos sobre la distribución geográfica de las principales especies de serpientes de importancia en salud pública.

De los numerosos ensayos desarrollados hasta la fecha (Theakston, 1983), se ha encontrado al ELISA como método más utilizados para la detección de venenos de serpientes y sus componentes tóxicos, así como sus respectivos anticuerpos (Selvanayagam y Gopalakrishnakone, 1999), permitiendo discernir con gran especificidad el tipo de serpiente responsable de un accidente, logrando superar el problema de reacción cruzada de los antígenos.

En el presente trabajo de investigación se ha utilizado el método de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos presentes en el suero de conejos inmunizados contra la EST del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Para esto se siguieron los lineamientos establecidos por la Escuela de Medicina Tropical de la Universidad de Liverpool - Inglaterra, centro de referencia a nivel mundial en el desarrollo de sistemas de detección de venenos y sus anticuerpos, y los cuales fueron modificados para su aplicación en este laboratorio (Sandoval *et al.*, 2006). Los resultados mostrados en la Fig. 10 indican que mediante la técnica de ELISA se pudieron detectar anticuerpos específicos con un título de 64000, calculado por el método de Alzamora *et al.* (2002), lo cual manifiesta que la proteína en estudio es inmunogénica.

Por otro lado, se estudió la reactividad inmunológica cruzada entre la EST de *Bothrops atrox* y otros venenos de serpientes peruanas consideradas de importancia en salud pública por la incidencia de su mordedura (Instituto Nacional de Salud, 2004). Para este fin, se empleó el método de ELISA mediante el cual se puede determinar si los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune reaccionan con los componentes proteicos de los venenos de serpientes. Como resultado de este análisis se obtuvo la densidad óptica más fuerte entre la EST del veneno de *B. atrox* y su respectivo suero (Fig. 11). Posteriormente, mediante ensayos de titulación, se observó reactividad cruzada con los otros venenos de serpiente, donde se obtuvieron títulos bajos contra los venenos de *B. atrox* y *B. brazili*, seguido por los venenos de *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* (Fig. 11).

Los venenos de serpientes son mezclas complejas de proteínas y péptidos los cuales contienen entre otros componentes varias serinoproteasas: enzimas coagulantes del fibrinógeno, liberadoras de kinina, incrementadoras de la permeabilidad capilar, activadoras del plasminógeno, activadoras de proteína C, activadoras del factor V, agregadoras de plaquetas, etc. La estructura primaria de estas enzimas comparte una homología considerable (60-70%) (Chippaux y Goyffon, 1998; Harrison *et al.*, 2003; Howes *et al.*, 2005), de forma que los anticuerpos policlonales preparados contra uno de estos puede reaccionar con otras enzimas homólogas, como se ha reportado para el activador del factor V del veneno de la serpiente *Vipera lebetina* (Siigur *et al.*, 2000), así como para miotoxinas aisladas de venenos de vipéridos del Brazil (Moura-da-Silva *et al.*, 1990), fosfolipasas A₂ (Choumet *et al.*, 1991) y otros componentes del veneno como la L-aminoácido oxidasa (Tan *et al.*, 1993; Tan y Ponnudurai, 1994).

Como resultado de estos análisis se sugiere una aparente falta de correlación entre las reacciones cruzadas observadas y las relaciones filogenéticas de las serpientes correspondientes, implicando que los resultados basados en el reconocimiento inmunogénico no reflejan totalmente la evolución molecular de las toxinas de venenos de serpiente (Boquet, 1979; Minton, 1979). Sin embargo, es generalmente aceptado que los anticuerpos responsables de la reactividad cruzada interactúan con proteínas funcionalmente similares presentes en los venenos de especies diferentes (Harrison *et al.*, 2003). Por esta razón los resultados obtenidos nos permiten considerar que los venenos de *B. brazili*, *L. muta* y *C. durissus* contienen proteínas estructuralmente relacionadas con la EST del veneno de *B. atrox*, las cuales están presentes en

menor abundancia a juzgar por los bajos porcentajes de reactividad cruzada encontrados.

En el desarrollo de tests de inmunodiagnóstico para la identificación rápida de la especie responsable de un envenenamiento, los componentes del veneno que reaccionan cruzadamente podrían dar lugar a ambigüedad o inclusive error en el diagnóstico (Marshall y Herrmann, 1984; McCarthy, 1984; Ho *et al.*, 1986). Los anticuerpos producidos contra la EST del veneno de *Bothrops atrox* mostraron un bajo nivel de reactividad cruzada contra los otros tres venenos en estudio, por lo que los estudios de inmunogenicidad de esta proteína serían la base para la preparación de anticuerpos específicos de especie como paso preliminar en el desarrollo del kit de diagnóstico. Un avance dentro de estos estudios lo reporta el trabajo de Sandoval *et al.*, (2006), donde utilizando columnas de afinidad con el veneno inmovilizado de *B. atrox* se pudieron capturar los anticuerpos IgG específicos a partir del suero hiperinmune. Queda por analizar si estos anticuerpos reaccionan específicamente contra otros venenos de serpientes empleando el sistema descrito en este trabajo.

Como un ejemplo de proteínas de veneno de serpiente utilizadas para la identificación de especies tenemos al activador de plasminógeno del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, el cual fue utilizado para la detección específica de esta serpiente mediante el sistema de ELISA sándwich (Felicori *et al.*, 2005). Dicha metodología permite la identificación del veneno de la serpiente *Lachesis muta* distinguiéndolo claramente de otros venenos de serpientes como los de *B. atrox*, *B. brazili*, *B. castelnaudi*, *B. taeniata*, *B. bilineata* y *C. d. ruruima* de Brasil.

Un aspecto interesante y práctico que se origina por los resultados obtenidos a partir de este estudio es si estas reactividades cruzadas determinadas por métodos inmunoenzimáticos reflejan la posibilidad de una potencial neutralización cruzada. Esto tendría que ser correlacionado con la acción de este antiveneno obtenido para neutralizar, por ejemplo, la actividad letal de los venenos heterólogos en estudio.

Finalmente, hay que considerar que la técnica de ELISA puede ser utilizada para la determinación de la concentración de la EST tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* ya que muestra gran reproducibilidad, alta sensibilidad y alta eficiencia. Además, cabe mencionar que este tipo de componentes viene siendo utilizado para el tratamiento terapéutico de desórdenes en el sistema de coagulación, por lo que es de suma utilidad evaluar la inmunoreactividad de estos componentes en las personas administradas, a fin de aumentar el tiempo de circulación de estos en los fluidos biológicos (Swenson *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* fue aislada a través de tres pasos cromatográficos: Una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75, una cromatografía de intercambio iónico en CM Sephadex C-50 y una cromatografía de afinidad en Agarosa - *p*-aminobenzamidina.
2. La enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* fue purificada 25.5 veces, con un rendimiento de 43.3% y una recuperación de proteína activa de 1.7%.
3. La enzima similar a trombina purificada presenta acción coagulante sobre el fibrinógeno, actividad amidolítica sobre los sustratos cromogénicos Benzoil Arginil *p*-nitroanilida (BApNA), S-2266, S-2238, así como actividad esterásica sobre el sustrato sintético Benzoil Arginil Etil Ester (BAEE). Sin embargo, no presentó actividad hidrolítica sobre el sustrato S-2251.
4. La enzima similar a trombina estudiada es una glicoproteína, la cual presentan un peso molecular de 29.6 kDa.
5. La enzima similar a trombina analizada presenta una alta homología con otras enzimas similares a trombina de Vipéridos, como la venombina A.

6. La enzima similar a trombina purificada es una proteína inmunogénica cuyos anticuerpos reaccionan en baja intensidad con otros componentes proteicos presentes en venenos de serpientes peruanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzamora L, Colona E, Vizcarra M. Manual de prácticas de inmunoserología. 2002. Primera Edición. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Anderson L. Isolation of thrombin-like activity from the venom of *Trimeresurus okinavensis*. Haemostasis. 1972;1(1):31-43.
- Bonilla CA. Defibrinating enzyme from timber rattlesnake (*Crotalus h. horridus*) venom: a potencial agent for therapeutic defibrination. 1. Purification and properties. Thromb Res. 1975;6(2):151-69.
- Boquet P. History of snake venom research. In: Lee C-Y (Ed). Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology: New Series; v. 52). Germany: Springer-Verlag; 1979. p. 3-14.
- Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie. 2000;82(9-10):851-9.
- Campbell JA, Lamarck WW. The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1989.

- Carrillo N, Icochea J. Lista taxonómica de los reptiles vivientes del Perú. Lima: Publicaciones del Museo de Historia Natural-UNMSM. Serie A, Nº 49; 1995.
- Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta*. 2001;1547(2):183-95.
- Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7-8):843-56.
- Cavinato RA, Remold H, Kipnis TL. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon*. 1998;36(2):257-67.
- Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
- Choumet V, Jiang MS, Specker I, Bon C. Immunochemical cross-reactivity of two phospholipase A2 neurotoxins, agkistrodotoxin and crotoxin. *Toxicon*. 1991;29(4-5):441-51.
- Christensen, P.A. 1979. Production and standardization of antivenin. In: Lee, C.Y. (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. Springer, Berlin, pp. 825-47.

- Claus I, Mebs D. Cross-neutralization of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. *Toxicon*. 1989;27(12):1397-9.
- DeGroot, J. 2000. "Bothrops atrox" (On-line). Animal Diversity Web. Accessed August 01, 2004 at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Bothrops_atrox.html
- Devi A, Banerjee S, Copley AL. Coagulant and esterase activities of thrombin and *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. 1972;10(6):563-73.
- Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.
- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
- Felicori LF, Chávez-Olórtegui C, Sánchez EF. Specific identification of *Lachesis muta muta* snake venom using antibodies against the plasminogen activator enzyme, LV-PA. *Toxicon*. 2005;45(6):803-6.
- Friberger P. Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1982;162:1-298.

- Funk C, Gmür J, Herold R, Straub PW. Reptilase-R: A new reagent in blood coagulation. *Br J Haematol*. 1971;21(1):43-52.
- Harrison RA, Wüster W, Theakston RD. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon*. 2003;41(4):441-9.
- Heneine IF, Heneine LG. Stepwise iodination. A general procedure for detoxification of proteins suitable for vaccine development and antiserum production. *Biologicals*. 1998;26(1):25-32.
- Herbert WJ, Lumsden WH. Single-dose vaccination of mice against experimental infection with *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei*. *J Med Microbiol*. 1968;1(1):23-32.
- Heredia V, Campos S, Yarlequé A. 5'nucleotidase activity in the venom of *Bothrops atrox* (L.) Jergón. *Acta Cient Venez*. 1982;33(4):333-7.
- Herzig RH, Ratnoff OD, Shainoff JR. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. *J Lab Clin Med*. 1970;76(3):451-65.
- Howes JM, Theakston RD, Laing GD. Antigenic relationships and relative immunogenicities of isolated metalloproteinases from *Echis ocellatus* venom. *Toxicon*. 2005;45(5):677-80.

- Ho M, Warrell MJ, Warrell DA, Bidwell D, Voller A. A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon*. 1986;24(3):211-21.
- Huatuco S, Escobar E, Yarlequé A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Rev Peru Biol*. 2004;11(1):79-86.
- Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
- Itoh N, Tanaka N, Funakoshi I, Kawasaki T, Mihashi S, Yamashina I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7628-31.
- Jin Y, Lu QM, Chen RQ, Wu JB, Xiong YL. Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*. 2005;45(3): 353-60.
- Kaiser E, Michel H. Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: Bucherl W, Buckley EE (Eds.): *Venomous animals and their venoms*. New York - London: Pergamon Press; 1986. p. 307-18.
- Kaiser II, Middlebrook JL. Preparation of a crotoxin neutralizing monoclonal antibody. *Toxicon*. 1988;26(9):855-65.

- Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 1996;34(6):627-42.
- Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):200-4.
- Labib RS, Azab MH, Farag NW. Effects of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) and *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snake venoms on blood coagulation: separation of coagulant and anticoagulant factors and their correlation with arginine esterase and protease activities. *Toxicon*. 1981;19(1):85-94.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Lee C-Y. Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology: New Series; v. 52). Germany: Springer-Verlag; 1979.
- Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quim Perú*. 1985;52(3):151-63.
- Loja D, Avilés R, Necochea Y, Vilca M, Castro J. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico*. 2000;38(5):261-5.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. J Thromb Haemost. 2005;3(8):1791-9.

Magalhaes A, Ferreira RN, Richardson M, Gontijo S, Yarleque A, Magalhaes HP, *et al.* Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2003;136(2):255-66.

Magalhães HP, Magalhães A, Juliano L, Nelson DL, Rogana E. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl *p*-nitroanilide substrates. Toxicon. 2006;47(4):453-8.

Markland FS, Damus PS. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). J Biol Chem. 1971;246(21):6460-73.

Marshall LR, Herrmann RP. Cross-reactivity of bardick snake venom with death adder antivenom. Med J Aust. 1984;140(9):541-2.

Meneses O. Los animales venenosos y sus peligros. Publicación N° 2. Lima: Instituto de Salud Pública; 1974.

- Minton, S.A., Jr. 1979. Common antigens in snake venoms. In: Lee, C.Y. (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52. Springer, Berlin, pp. 847-862.
- Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. Toxicon. 1990;28(11):1293-301.
- McCarthy NJ. Snake venom detection kit. Med J Aust. 1984 Apr 28;140(9):518.
- Nahas L, MacFarlane RG, Denson KW. A study of the coagulant action of eight snake venoms. Thromb Diath Haemorrh. 1964;12:355-67.
- Nakamura M, Kinjoh K, Kosugi T. Production of a monoclonal antibody against the thrombin-like enzyme, habutobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. Toxicon. 1992;30(10):1177-88.
- Nakamura M, Hanashiro K, Kosugi T. A modification of the ELISA-double sandwich method for estimating the concentration of habutobin. Toxicon. 1993;31(10):1325-8.
- Nakamura M, Kinjoh K, Miyagi C, Oka U, Sunagawa M, Yamashita S, *et al.* Pharmacokinetics of habutobin in rabbits. Toxicon. 1995;33(9):1201-6.

- Orejuela P, Zavaleta A, Salas M, Marsh N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. *Toxicon*. 1991;29(2):1151-4.
- Oshima G, Iwanaga S. Occurrence of glycoproteins in various snake venoms. *Toxicon*. 1969;7(3):235-8.
- Ouyang C. The effects of Formosan snake venoms on blood coagulation in vitro. *J Formosan Med Ass*. 1957;56:435-41.
- Pantigoso C, Escobar E, Málaga O, Yarlequé A. Isolation and some properties of the proteinase atroxin from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Acta Cient Venez*. 1996;47(1):67-73.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67.
- Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(11):1293-300.
- Pirkle H, Theodor I, Miyada D, Simmons G. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. *J Biol Chem*. 1986;261(19):8830-5.

- Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb Haemost*. 1998;79(3):675-83.
- Pope CH. *The Reptile World*. New York: Knopf AA, 1955. 325pp.
- Russell FE. Snake venom poisoning. New York, NY: Scholium International Inc; 1983:1-562.
- Sandoval G, Lerma L, Rodríguez E, Yarleque A, Espinoza Y, Solis H, *et al*. Purificación de anticuerpos policlonales contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). *Rev Soc Quim Perú*. 2006;72(3):140-9.
- Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1955;16(4):570-5.
- Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon*. 1999;37(4):565-86.
- Siigur E, Samel M, Tõnismägi K, Siigur J. Cross-reactivities of polyclonal antibodies against factor V activating enzyme, a serine proteinase from *Vipera lebetina* (snake) venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000;126(3):377-82.

- Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. 1998;36(7):1059-63.
- Stocker K, Christ W, Leloup P. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen agarose. *Toxicon*. 1974;12(4):415-7.
- Stocker K, Fischer H, Meier J. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon*. 1982;20(1):265-73.
- Stocker K: Application of snake venom proteins in the diagnosis of hemostatic disorders. In: Stocker K (ed): *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, CRC Press, 1990a, pp 97-160.
- Stocker K: Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker K (ed): *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, CRC Press, 1990b, pp 97-160.
- Swenson S, Costa F, Minea R, Sherwin RP, Ernst W, Fujii G, *et al*. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(4):499-511.
- Tan NH, Lim KK, Jaafar MI. An investigation into the antigenic cross-reactivity of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom neurotoxin, phospholipase A2, hemorrhagin and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*. 1993;31(7):865-72.

- Tan NH, Ponnudurai G. An investigation on the antigenic cross-reactivity of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom hemorrhagin, thrombin-like enzyme and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*. 1994;32(10):1265-9.
- Theakston RD. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*. 1983;21(3):341-52.
- Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41(5):541-57.
- Underwood G. Classification and distribution of venomous snakes in the world. In: Lee C-Y (Ed). *Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology: New Series; v. 52)*. Germany: Springer-Verlag; 1979.
- Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Gärungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
- Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*. 1959;234(8):1971-5.
- Winzler RJ. Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochemical Anal*. 1955;2:279-311.

Yarleque A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sanchez N, Hyslop S, *et al.*
Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom
of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*.
1989;27(11):1189-97.

Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial-
UNMSM; 2000.

Zhao H, Zheng J, Jiang Z. Pharmacokinetics of thrombin-like enzyme from
venom of *Agkistrodon halys ussuriensis* Emelianov determined by ELISA in
the rat. *Toxicon*. 2001;39(12):1821-6.

ILUSTRACIONES



Figura 1. La serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón")

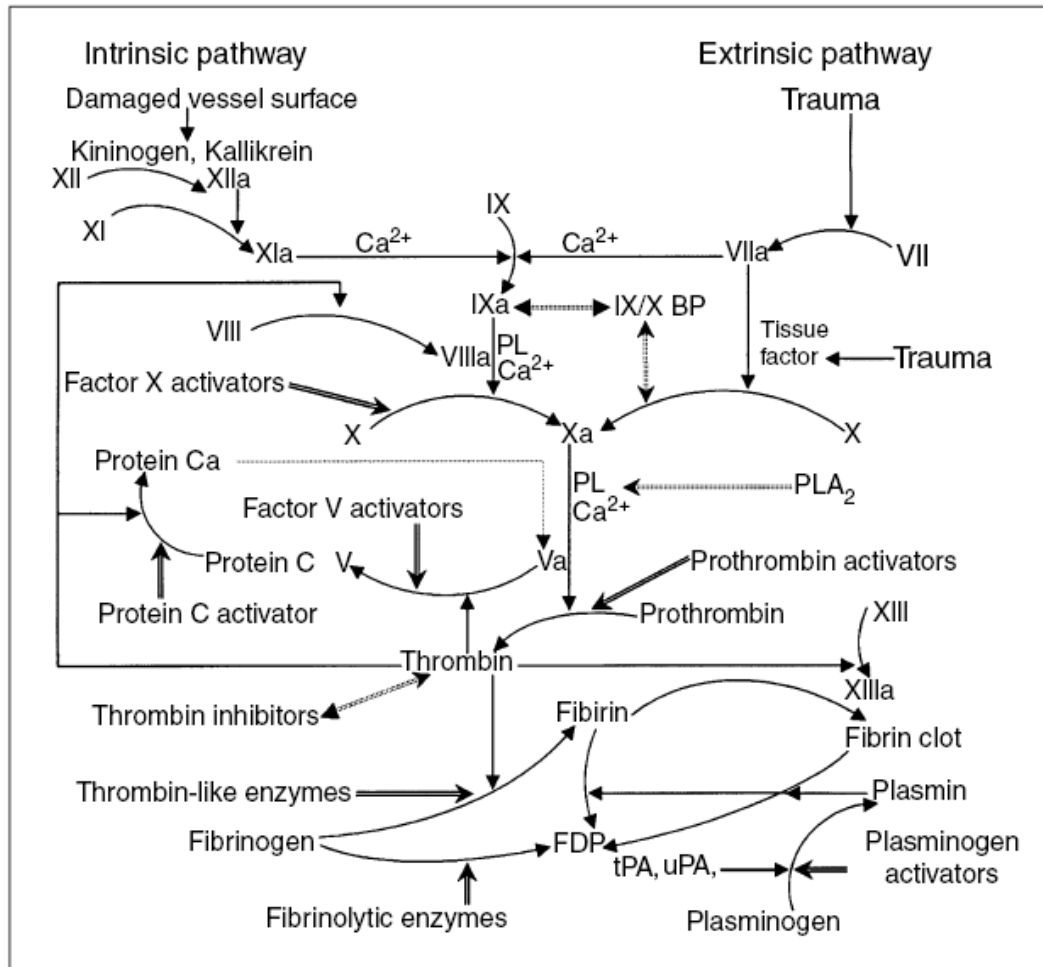
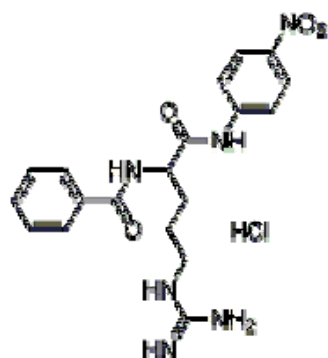
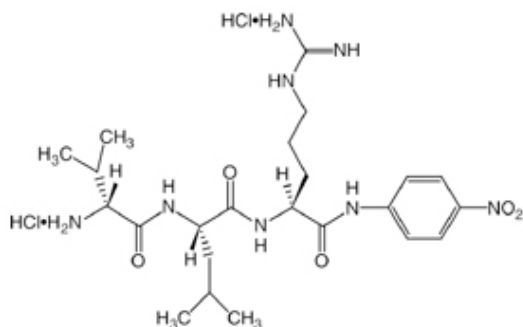


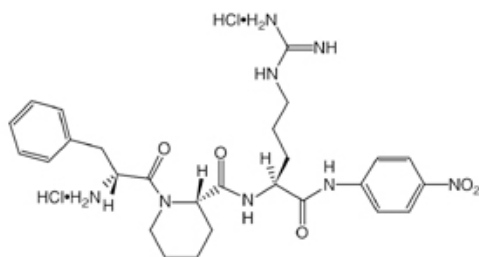
Figure 2. Esquema de la coagulación sanguínea y de la fibrinólisis mostrando los sitios de acción de las proteínas de veneno de serpientes (Tomado de Lu *et al.*, 2005).



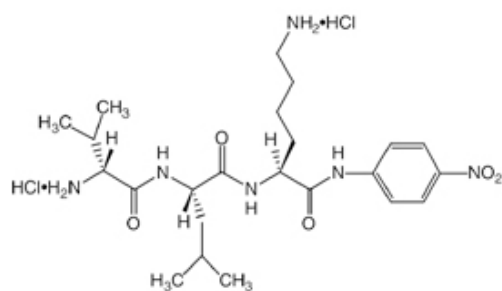
**N α -Benzoil-DL-arginina
p-nitroanilida (BApNA)**



**H-D-valina-leucina-arginina
p-nitroanilida (S-2266)**



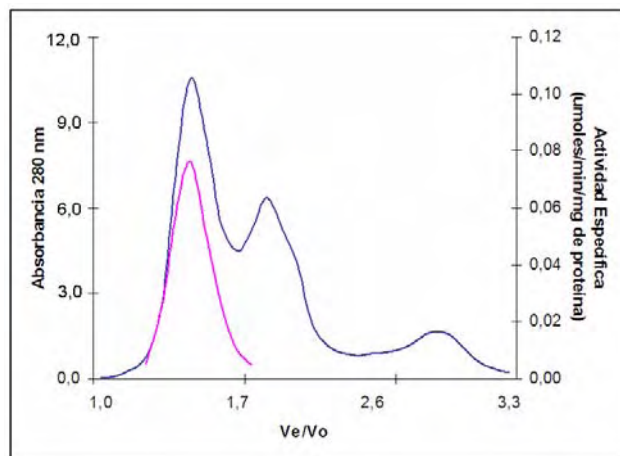
**H-D-fenil-pipecolil-arginina
p-nitroanilida (S-2238)**



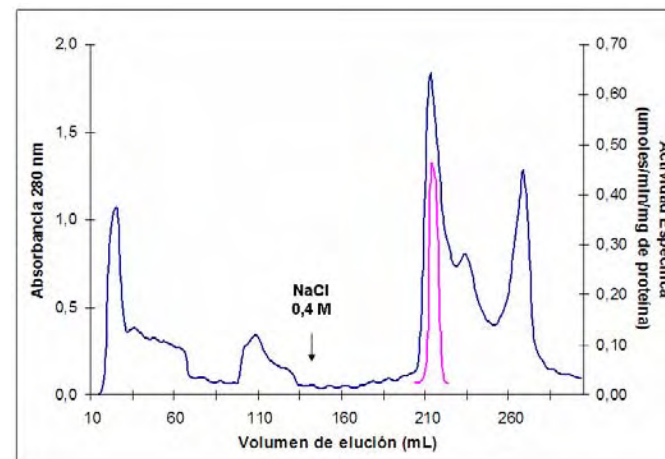
**H-D-valina-leucina-lisina *p*-
nitroanilida (S-2251)**

Figure 3. Sustratos sintéticos empleados para la caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Tomado de Friberger, 1982).

A



B



C

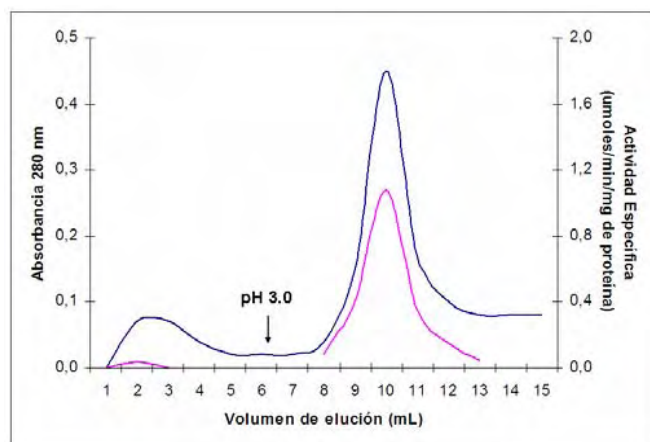


Figura 4. Esquema de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*. (A) Fraccionamiento del veneno crudo en Sephadex G-75 empleando buffer acetato de amonio pH 6.0. Las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron concentradas. **(B)** Separación de las fracciones previas en una columna de CM Sephadex C-50. Las fracciones eluidas con NaCl 0.4 M fueron desaladas, concentradas y aplicadas a un tercer paso cromatográfico empleando una columna de Agarosa-PAB **(C)** empleando buffer Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.5 M, pH 7.5. Las fracciones retenidas fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0.5 M, pH 3.0. La línea azul indica la absorbancia a 280 nm, mientras que la línea

Tabla 1. Cuadro resumen de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*

Procedimiento	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg proteína)	Actividad (U)*	Rend. (%)	Purificación (veces)
1º VENENO CRUDO	200.0	0.034	6.86	100.0	1.0
2º SEPHADEX G-75	51.6	0.081	4.20	61.2	2.4
3º CM SEPHADEX C-50	7.0	0.542	3.79	55.3	15.8
4º AGAROSA - PAB	3.4	0.874	2.97	43.3	25.5

* La actividad enzimática fue determinada empleando Benzoil DL Arginina *p*-nitroanilida como sustrato. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de μ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) bajo condiciones no reductoras de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*.

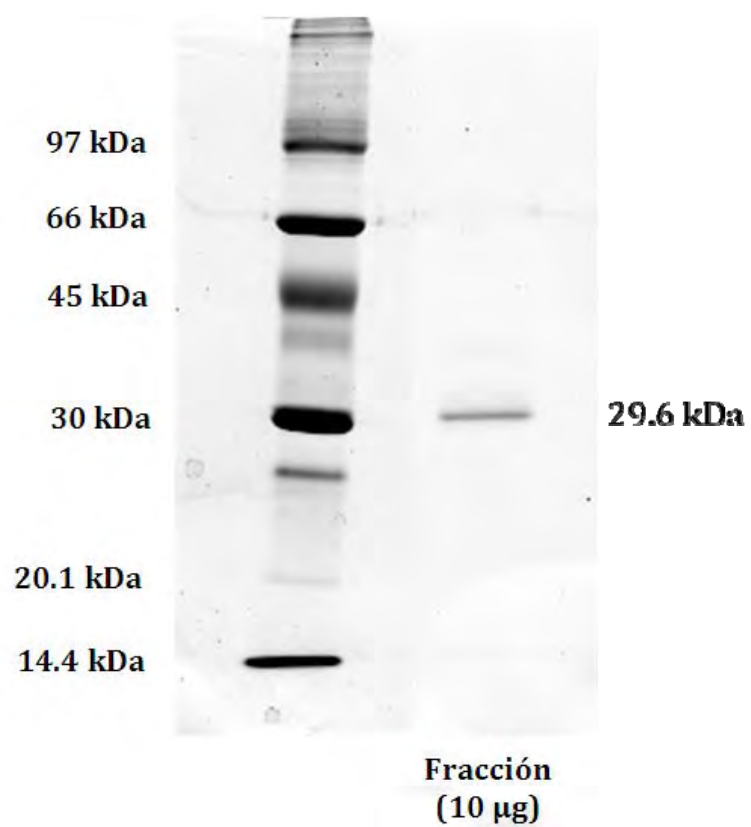


Tabla 2. Actividad del veneno total y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox* sobre diferentes sustratos

Sustrato	pH	Actividad Específica (U/mg proteína)		Incremento de la actividad
		Veneno crudo	Enzima	
Fibrinógeno Bovino	7.4	1.26	5.50	4.4
BApNA	8.1	0.034	0.874	25.5
BAEE	7.4	1.96	45.8	23.4
S-2266	7.5	7.8	23.4	3.0
S-2238	7.5	8.7	22.7	2.6
S-2251	7.5	0.0	0.0	0.0

Tabla 3. Contenido de carbohidratos del veneno crudo y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*

Componente	Porcentaje (%)	
	Veneno Crudo	Enzima
Hexosas	1.83	12.1
Hexosamina	0.61	1.36
Ácido siálico	0.19	0.75
Total de carbohidratos asociados	2.63	14.21

Tabla 4. Contenido de carbohidratos y peso molecular de enzimas similares a trombina aisladas de diferentes venenos de serpiente.

Serpiente (enzima)	Contenido de carbohidratos (%)	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>L. m. rhombeata</i> (giroxina)	13.8	47.0	Aguiar <i>et al.</i> (1996)
<i>L. m. muta</i> (giroxina)	13.4	40.0	Yarleque <i>et al.</i> (1989)
<i>L. m. noctivaga</i>	N.D.	36.3	Magalhães <i>et al.</i> (1981)
<i>A. rhodostoma</i> (ancrod)	N.D.	31.3	Nolan <i>et al.</i> (1976)
<i>C. adamanteus</i> (crotalasa)	5.4	32.7	Markland (1976)
<i>B. a. moojeni</i> (batroxobina)	27.0	29.0	Holleman y Weiss (1976)
<i>B. insularis</i>	22.0	45.0	Selistre y Giglio (1987)
<i>B. gabonica</i>	20.6	30.6	Pirkle <i>et al.</i> (1986)
<i>B. alternatus</i>	N.D.	30.0	Smolka <i>et al.</i> (1998)
<i>B. atrox</i>	14.2	29.6	Presente trabajo

Figura 6. Espectro de masas de los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*. Se muestran los valores de masa/carga para cada uno de los fragmentos versus la intensidad de señal en escala porcentual.

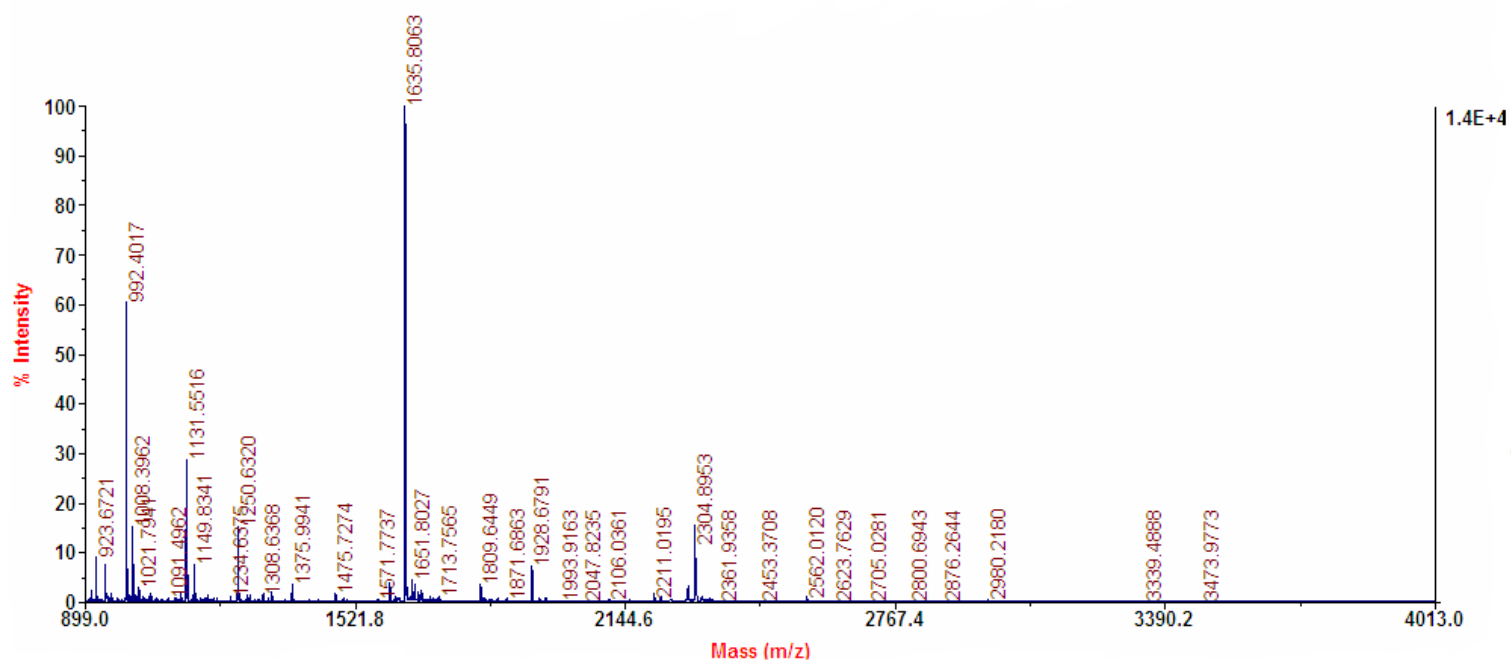


Figura 7. Vista principal del programa on-line MASCOT en la modalidad *Peptide Mass Fingerprint* (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF). Se muestran los parámetros iniciales de búsqueda para los péptidos recuperados: Cys como el derivado S-carbamidoetilado (modificación fija) y Met en su forma oxidada (modificación variable). Database (MSDB) y Enzyme (Trypsin)

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Gustavo Email: gustavosan0510@gmail.com

Search title:

Database: MSDB

Taxonomy: All entries

Enzyme: Trypsin Allow up to: 1 missed cleavages

Fixed modifications: Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Carbamyl (N-term)

Variable modifications: NIPCAM (C), Oxidation (HW), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y)

Protein mass: kDa Peptide tol. ±: 1 Da

Mass values: ☒ MH+ ☐ Mr ☐ M-H+ Monoisotopic: ☒ Average ☐

Data file: Examiner...

Query: 4249.9409, 4478.0267, 3552.6344, 3666.6773, 3568.6293, 2672.2112

Decoy: ☐ Report top: 20 hits

Start Search ... Reset Form

Copyright © 2008 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved.

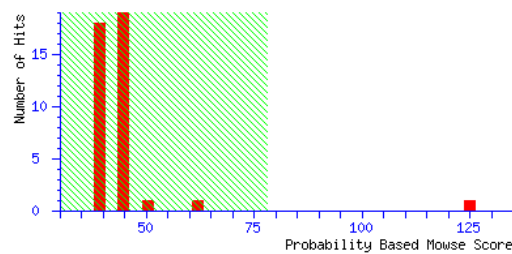
Figura 8. Resultados obtenidos del análisis *in silico* mediante el programa MASCOT. Se observan las proteínas de mayor homología con la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox* en orden decreciente de *score*, indicando el número de péptidos emparejados.

Mascot Search Results

User : Gustavo
 Email : gustavosan0510@gmail.com
 Search title :
 Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)
 Timestamp : 14 Jan 2009 at 07:28:51 GMT
 Top Score : 125 for **A28169**, venombin A (EC 3.4.21.74) precursor - barba amarilla

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 78 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

- [A28169](#) Mass: 28854 Score: **125** Expect: $1e-06$ Queries matched: 14
 venombin A (EC 3.4.21.74) precursor - barba amarilla

[AAA48553](#) Mass: 28840 Score: **103** Expect: 0.00016 Queries matched: 12
 BOTBTXA5 NID: - Bothrops atrox

[A54361](#) Mass: 26252 Score: 78 Expect: 0.054 Queries matched: 10
 venombin A (EC 3.4.21.74) [validated] - jararaca

[Q5W960_BOTJA](#) Mass: 28654 Score: 41 Expect: $2.3e+02$ Queries matched: 8
 Hypothetical protein precursor.- Bothrops jararaca (Jararaca).

[AAN58871](#) Mass: 12474 Score: 40 Expect: $3.2e+02$ Queries matched: 5
 AE014133 NID: - Streptococcus mutans UA159

Figura 9. Análisis de los fragmentos obtenidos de la espectrometría de masas empleando el programa MASCOT. (A) Secuencia completa de la venombina A indicando los fragmentos correspondientes a la enzima similar a trombina de *B. atrox* (rojo). (B) Relación de las masas relativas obtenidas y esperadas de la hidrólisis de la enzima en estudio en comparación con la venombina A.

A

```

1  MVLIRVIANL LILQVSYAQK SSELVIGGDE CDINEHPFLA FMYSPRYFC
51 GMTLINQEWV LTAAHCNRRF MRIHLGKHAG SVANYDEVVR YPKEKFICPN
101 KKKNVITDKD IMLIRLDRPV KNSEHIAPLS LPSNPPSVGS VCRIMGWGAI
151 TTSEDTPDV PHCANINLFN NTVCREAYNG LPAKTLCAGV LQGGIDTCGG
201 DSGGPLICNG QFQGILSWGSDPCAEPKPA FYTKVFDYLP WIQSIIAGNK
251 TATCP

```

B

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
48 - 68	2584.1893	2583.1820	2583.1821	-0.0001	0	R.YFCGMTLINQEWVLTAAHCNR.R
73 - 77	567.3613	566.3540	566.3540	0.0000	0	R.IHLGK.H
78 - 90	1416.6866	1415.6793	1415.6793	-0.0000	0	K.HAGSVANYDEVVR.Y
96 - 101	778.3916	777.3843	777.3843	-0.0000	0	K.FICPNK.K
104 - 109	689.3828	688.3755	688.3755	-0.0000	0	K.NVITDK.D
110 - 115	760.4385	759.4312	759.4313	-0.0001	0	K.DIMLIR.L
110 - 115	776.4335	775.4262	775.4262	0.0000	0	K.DIMLIR.L Oxidation (M)
116 - 121	727.4461	726.4388	726.4388	0.0000	0	R.LDRPVK.N
122 - 143	2318.1557	2317.1484	2317.1485	-0.0000	0	K.NSEHIAPLSLPSNPPSVGSVCRI
144 - 175	3666.6773	3665.6700	3665.6701	-0.0001	0	R.IMGWGAIITTSIEDTPDVPHCANINLFNNTVCR.E
176 - 184	962.4941	961.4868	961.4869	-0.0000	0	R.EAYNGLPAK.T
185 - 227	4478.0267	4477.0194	4477.0196	-0.0002	0	K.TLCAGVLQGGIDTCGGDSGGGPLICNGQFQGILSWGSDPCAEPK.K
228 - 234	854.4770	853.4697	853.4698	-0.0000	0	R.KPAFYTK.V
235 - 250	1864.0003	1862.9930	1862.9931	-0.0000	0	K.VFDYLPWISIIAGNK.T

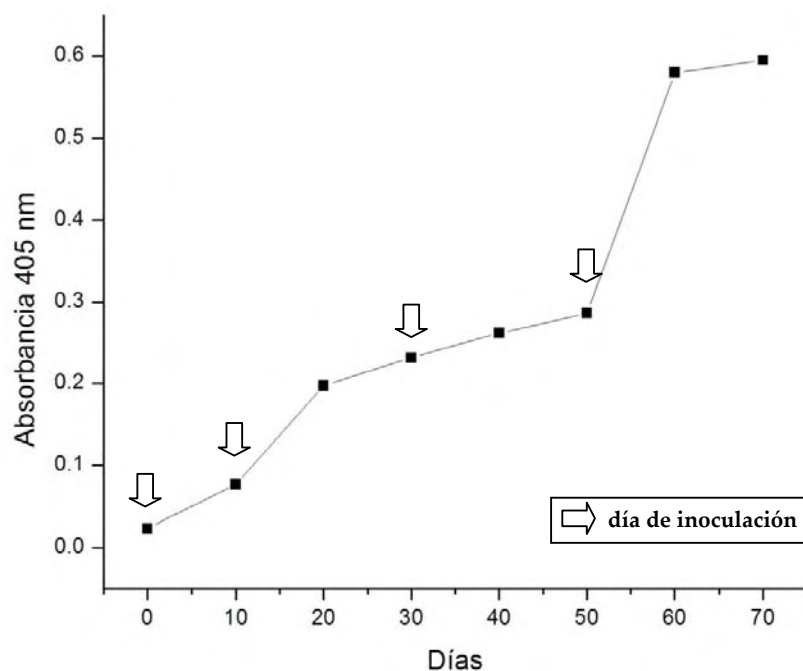


Figura 10. Detección de IgG anti-EST de *B. atrox* en el suero de conejos inmunizados mediante la técnica de ELISA.

Se cubrieron placas de 96 pocillos con 100 μ L de EST de *B. atrox* (1.0 μ g/mL) y se dejaron incubar durante una noche a 4 °C. Luego las placas fueron incubadas con suero de conejo obtenido al día 90 del protocolo de inmunización (1/25600) y los inmunocomplejos fueron detectados con un anti-IgG de conejo (1/4000) acoplado a fosfatasa alcalina usando como sustrato *p*-nitroanilida (1 mg/mL). La reacción enzimática fue detenida al cabo de 30 min con NaOH 3 M, registrándose la absorbancia a 405 nm en un lector de placas.

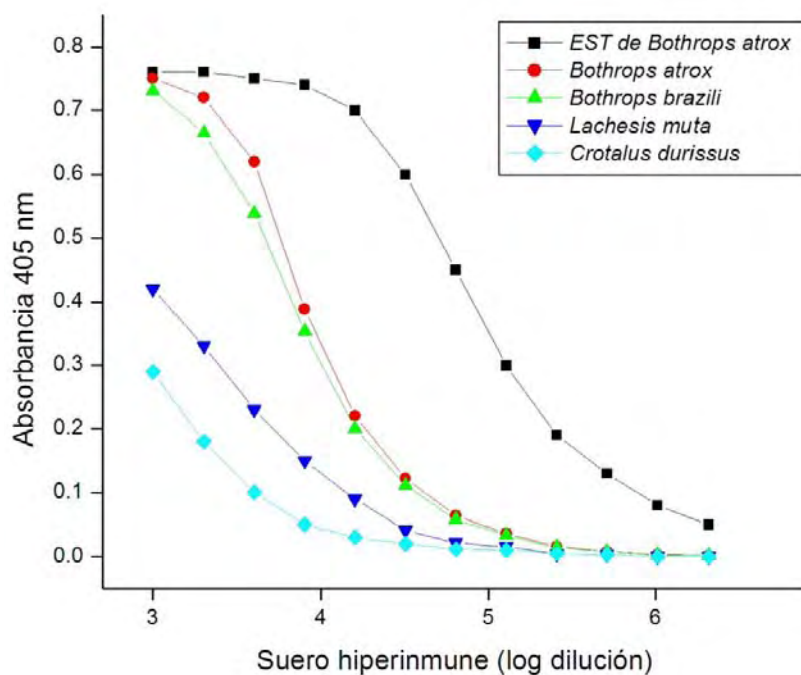


Figura 11. Evaluación de la reacción inmunológica cruzada del suero anti-EST con la EST de *B. atrox* y algunos venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de ELISA.

Se cubrieron placas de 96 pocillos con EST (1.0 µg/mL, 100 µL/pocillo) y los venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* (0.25 µg/mL, 100 µL/pocillo) para luego ser incubados con suero hiperinmune anti-EST (diluido a partir de 1/1000). Los inmunocomplejos fueron visualizados mediante incubación con anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1/4000) seguido de la adición de *p*-nitroanilida.